

UNIVERSIDAD DE HUANUCO
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERIA AMBIENTAL



TESIS

**“DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES A
PARTIR DE LOS DESECHOS DE HOJARASCAS EN LA
MONTAÑA DE LA MARGEN DERECHA DEL RIO COZO,
DISTRITO DE QUISQUI, PROVINCIA Y DEPARTAMENTO DE
HUÁNUCO - 2019”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AMBIENTAL**

AUTOR: Vincula Lorenzo, Juan Jaime

ASESOR: Riveros Agüero, Elmer

HUÁNUCO – PERÚ

U

D

H



TIPO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:

- Tesis (X)
- Trabajo de Suficiencia Profesional()
- Trabajo de Investigación ()
- Trabajo Académico ()

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN: Modelación, análisis y control de la contaminación ambiental.

AÑO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN (2018-2019)

CAMPO DE CONOCIMIENTO OCDE:

Área: Ingeniería, Tecnología

Sub área: Ingeniería ambiental

Disciplina: Ingeniería ambiental y geológica

DATOS DEL PROGRAMA:

Nombre del Grado/Título a recibir: Título

Profesional de Ingeniero Ambiental

Código del Programa: P09

Tipo de Financiamiento:

- Propio (X)
- UDH ()
- Fondos Concursables ()

DATOS DEL AUTOR:

Documento Nacional de Identidad (DNI): 45750766

DATOS DEL ASESOR:

Documento Nacional de Identidad (DNI): 28298517

Grado/Título: Maestro en Administración y Gerencia en salud.

Código ORCID: 0000-0003-3729-5423

DATOS DE LOS JURADOS:

| N° | APELLIDOS Y NOMBRES | GRADO | DNI | Código ORCID |
|----|--------------------------------|--|----------|---------------------|
| 1 | Camara Llanos, Frank Erick. | Maestro en ciencias de la salud con mención en: salud pública y docencia universitaria | 44287920 | 0000-0001-9180-7405 |
| 2 | Salas Vizcarra, Christian Joel | Magister en derecho y ciencias políticas. Derecho Procesal | 41135525 | 0000-0003-4745-4889 |
| 3 | Calvo Trujillo, Heberto | Ingeniero Agrónomo | 22464839 | 0000-0003-2475-1362 |



UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

Facultad de Ingeniería

E.A.P. DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO (A) AMBIENTAL

En la ciudad de Huánuco, siendo las 17:00 horas del día 09 del mes de MARZO del año 2020, en el Auditorio de la Facultad de Ingeniería, en cumplimiento de lo señalado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad de Huánuco, se reunieron el **Jurado Calificador** integrado por los docentes:

Mg. FRANK ERICK CAJAMA HANOS (Presidente)
Mg. CRISTIAN JOEL SALAS VICCARA (Secretario)
Ing. HEBERTO CALVO TRUJILLO (Vocal)


Nombrados mediante la Resolución N° 175-2020-D-FI-UDH, para evaluar la **Tesis** intitulada:

"DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES A PARTIR DE LOS DESECHOS DE HUIBARSCAS EN LA MONTAÑA DE LA MARGEN DERECHA DEL RÍO COZO, DISTRITO DE OUSIBUS, PROVINCIA Y DEPARTAMENTO DE HUÁNUCO - 2019", presentada por el (la) Bachiller JUAN JAIME VINCOLA LORENZO, para optar el Título Profesional de Ingeniero (a) Ambiental

Dicho acto de sustentación se desarrolló en dos etapas: exposición y absolución de preguntas: procediéndose luego a la evaluación por parte de los miembros del Jurado.

Habiendo absuelto las objeciones que le fueron formuladas por los miembros del Jurado y de conformidad con las respectivas disposiciones reglamentarias, procedieron a deliberar y calificar, declarándolo (a) APROBADO por UNANIMIDAD con el calificativo cuantitativo de BUENO y cualitativo de QUINCE (Art. 47)

Siendo las 17:46 horas del día 09 del mes de MARZO del año 2020, los miembros del Jurado Calificador firman la presente Acta en señal de conformidad.


Presidente


Secretario


Vocal

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por ser esa fuerza omnipotente y guiarme siempre, por darme convicción, salud y las fuerzas necesarias para culminar mi carrera profesional con satisfacción, con mucho cariño y respeto para mis padres por el amor, el ejemplo y el apoyo incondicional en el camino recorrido de mi vida, gracias por darme ese apoyo y por confiar en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre como un gran equipo hemos sabido sobresalir y seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Quiero dar realce y brindar mi reconocimiento y gratitud a la Facultad de Ingeniería, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental, de la prestigiosa Universidad de Huánuco, al personal directivo, docente y administrativo que contribuyeron a mi formación académica.

A mi asesor Mg. Elmer Riveros Agüero, por su ayuda desinteresada, sus valiosas sugerencias y por haber realizado las correcciones y recomendaciones necesarias para el cumplimiento de los objetivos.

A mis padres y hermanas quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyeron en mí en todo momento.

.Por último y no menos importante, mi eterna gratitud a todos aquellas personas que de una u otra forma fueron participes, gracias por brindarme su tiempo, paciencia y ser apoyo en momentos de decline y cansancio, un gracias por ser parte de mis sueños.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|------|
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTO | III |
| ÍNDICE GENERAL..... | IV |
| ÍNDICE DE TABLAS | VI |
| ÍNDICE DE FIGURAS | VII |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | VIII |
| RESUMEN | IX |
| ABSTRACT | XI |
| INTRODUCCIÓN | XIII |
| CAPÍTULO I | 15 |
| 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 15 |
| 1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA | 15 |
| 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | 16 |
| 1.3 OBJETIVO GENERAL | 17 |
| 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:..... | 17 |
| 1.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN: | 17 |
| Personal | 17 |
| Social..... | 18 |
| Científica | 18 |
| 1.6 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN | 19 |
| 1.7 VIABILIDAD DE LA INVESTIGACIÓN..... | 21 |
| CAPÍTULO II | 23 |
| MARCO TEÓRICO | 23 |
| 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN | 23 |
| 2.1.1. Antecedentes Internacionales: | 23 |
| 2.1.2. Antecedentes Nacionales:..... | 26 |
| 2.1.3. Antecedentes Locales: | 31 |
| 2.2. BASES TEÓRICAS | 36 |
| 2.2.1. Biotecnología..... | 36 |
| 2.2.2. Microorganismos eficientes | 37 |
| 2.2.3. Microorganismos de tierra de montaña. | 41 |
| 2.2.4. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos eficientes. ... | 43 |

| | |
|---|----|
| 2.2.5. Metodologías de aislamiento..... | 47 |
| 2.2.6. Base legal. | 50 |
| 2.3. DEFINICIONES CONCEPTUALES:..... | 51 |
| 2.4. VARIABLES..... | 52 |
| CAPÍTULO III..... | 53 |
| MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN..... | 53 |
| 3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN | 53 |
| 3.1.1. La Enfoque de la investigación. | 53 |
| 3.1.2. Alcance o nivel de investigación..... | 53 |
| 3.1.3. Diseño de la Investigación. | 54 |
| 3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA | 55 |
| 3.2.1. Población | 55 |
| 3.2.2 Muestra | 55 |
| 3.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN..... | 58 |
| 3.3.1 Para la Recolección de Datos | 58 |
| CAPITULO IV..... | 63 |
| RESULTADOS..... | 63 |
| 4.1. CONTRASTE Y PRUEBA DE HIPOTESIS..... | 73 |
| 4.1.1. Contraste de la hipótesis general: | 73 |
| CAPITULO V..... | 74 |
| DISCUSION DE RESULTADOS..... | 74 |
| CONCLUSIONES | 79 |
| RECOMENDACIONES..... | 82 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |
| ANEXOS..... | 86 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Coordenadas de ubicación del proyecto | 20 |
| Tabla 2. Métodos De Aislamiento Frecuentes | 47 |
| Tabla 3. Medios de cultivos específicos..... | 54 |
| Tabla 4. Ubicación del punto de muestreo en la margen derecha del rio Cozo | 56 |
| Tabla 5. Insumos para la producción de MEM..... | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Accesibilidad y área de influencia | 20 |
| Figura 2. Ubicación del lugar de recolección de hojarasca. | 57 |
| Figura 3. Procedimiento para la preparación de disoluciones | 60 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Matriz de consistencia | 87 |
| Anexo 2. Ficha de identificación de punto de muestreo..... | 88 |
| Anexo 3. Ficha de materiales utilizados para la reproducción de MEM..... | 89 |
| Anexo 4. Resultados emitidos por el laboratorio Carlos Showin Ferrari | 90 |
| Anexo 5. Mapa. Localización de zona de recolección de hojarascas | 91 |
| Anexo 6. Mapa. Área de influencia | 92 |

RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulada; “*Determinación de microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarasca en la montaña de la margen derecha del rio Cozo, Distrito De Quisqui, provincia y departamento de Huánuco – 2019*” tuvo como **objetivo** determinar microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarasca en la montaña del margen derecha del rio Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco, 2019. La **metodología** que se empleó para lograr este objetivo fue la siguiente; el enfoque es Mixto, debido a que combino componentes cualitativos y cuantitativos en la investigación ejecutada, se utilizó el Diseño Completo al Azar (DCA); solo con una muestra analizada; de los diferentes tubos de ensayo del cual se utilizó 1 ml de solución que se aplicó en placas Petri con medios de cultivo específicos positivos para los microorganismos, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *actinomicetos* y *Pseudomonas spp.* Los **resultados** que obtuvimos fueron los siguientes: *Primero:* se seleccionó y recolecto la hojarasca del bosque del margen derecho del rio Cozo, lugar denominado Paccha, el trabajo tuvo una duración que se consigna en los resultados de la investigación, cabe mencionar que tres actividades se ejecutaron para la selección y recolección de hojarasca. *Segundo:* con los dos sacos recolectados de hojarasca se procedió a la elaboración de la mezcla del cultivo de los MEM a través de una metodología tomada de (CNEAO-INA). *Tercero:* Después 30 días que se dejó reposar la mezcla para el crecimiento de los MEM; se inició con el aislamiento de microorganismos, mediante los cultivos genéricos. Cinco fueron los cultivos donde se encontraron; Agar sabouraud (*levaduras*); Agar nutritivo (*Bacillus*

spp); Agar avena (*Actinomicetos*); Agar cetrímide (*Pseudomonas spp*); y Agar rogosa (*Lactobacillus sp*). *Cuarto*: finalmente una vez identificado cada especie se procedió a la caracterización in vitro de los microorganismos aislados, para ello se utilizó la coloración Gram. **Conclusión:** se logró identificar microorganismos benéficos de montaña que tienen importancia biotecnológica.

Palabras clave: *Microorganismo eficiente, hojarasca, diluciones, Agar, tinción Gram, aislamiento.*

ABSTRACT

The present research entitled; "Determination of efficient microorganisms from litter waste in the mountain on the right bank of the Cozo River, Quisqui District, province and department of Huánuco - 2019" aimed to determine efficient microorganisms from litter waste in the Mountain on the right bank of the Cozo river, Quisqui district, province and department of Huánuco, 2019. The methodology used to achieve this objective was the following; The approach is Mixed, because I combine qualitative and quantitative components in the executed research, the Randomized Complete Design (DCA) was used; only with a sample analyzed; of the different test tubes of which 1 ml of solution was used which was applied in Petri dishes with specific culture media positive for the microorganisms, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., actinomycetes and *Pseudomonas* spp. The results we obtained were the following: First: the leaf litter of the forest on the right bank of the Cozo river was selected and collected, called Paccha, the work had a duration that is recorded in the results of the investigation, it is worth mentioning that three activities are They executed for the selection and collection of litter. Second: with the two sacks collected from litter, the mixture of the MEM culture was elaborated through a methodology taken from (CNEAO-INA). Third: After 30 days the mixture was allowed to stand for MEM growth; It began with the isolation of microorganisms, through generic cultures. Five were the crops where they were found; Sabouraud agar (yeasts); Nutritive agar (*Bacillus* spp); Oatmeal agar (Actinomycetes); Cetrimide agar (*Pseudomonas* spp); and rocky agar (*Lactobacillus* sp). Fourth: finally, once each species was identified, the in vitro characterization of the isolated microorganisms was carried out. Gram staining

was used for this. Conclusion: it was possible to identify beneficial mountain microorganisms that have biotechnological importance.

Keywords: *Efficient microorganism, litter, dilutions, agar, Gram staining, isolation.*

INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo doy a conocer un estudio descriptivo sobre la determinación y el procedimiento de obtención de microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarasca recolectados en la montaña de la margen derecha del río Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco – 2019, el tiempo que duro la investigación desde el reconocimiento de la zona, recolección de muestras, aislamiento de microorganismos y caracterización in situ dio inicio los primeros días del mes de septiembre y culminó el 6 de noviembre con la emisión de los resultados por parte del servicio de laboratorio de microbiología del Hospital Materno Infantil “Carlos Showin Ferrari”, con una duración aproximadamente de 3 meses doy a conocer resultados que servirán más adelante para probar la eficiencia de estos microorganismos aislados en la parte biotecnológica o microbiológica.

El interés de esta investigación se debe hoy en día; ya que, gracias a este procedimiento, de determinación y aislamiento de microorganismos eficientes de montaña podemos elaborar productos que no dañen al medio ambiente como suelo, agua y aire por ejemplo la utilización de los MEM en medio líquido se aplica como foliares ya que está demostrado su importancia en el crecimiento de hojas y la fructificación, antes del sembrío como abono de tierras, y también se puede aplicarse al bokashi. Son tantos los beneficios de estos microorganismos que podemos hacer una caracterización específica de cada una de las especies identificadas con ello encontraremos también su importancia biotecnológica y microbiológica para el medio ambiente.

Esta investigación nos aporta datos relevantes en cuanto al procedimiento ideal utilizado para la obtención de microorganismos benéficos y la caracterización morfológica en situ de estos, datos que nos permitirá más adelante probar la eficacia de estos microorganismos sobre suelo, agua o aire según lo deseen otros investigadores, cabe mencionar también que para la obtención de MEM, solo se pueden extraer de lugares en donde la agricultura y agroquímicos no hayan intervenido el ecosistema en los últimos 3 años.

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Los microorganismos desempeñan un papel importante en los sistemas naturales, particularmente los promotores del crecimiento de las plantas (PGPM) (Trabelsi y Mhamdi, 2013), las cuales pueden beneficiarse de la función de estos seres microscópicos; trabajar con estos pequeños aliados invisibles, es un vínculo importante para la red de vida (Wilkinson, 2009). Agentes de control biológico (BCA), como *Trichoderma* y *Pseudomonas* spp., pueden controlar la enfermedad (efecto primario), pero recientemente han demostrado la estimulación del crecimiento de la planta (efecto secundario) en ausencia de un patógeno; gracias a sus multifacéticos efectos, el potencial aumento del uso de estos microorganismos beneficiosos, puede ayudar a reducir los problemas asociados con el uso de productos químicos sintéticos en la agricultura (Avis *et al.*, 2008).

Sin embargo, en la ciudad de Huánuco la tecnología para el cultivo sostenible es casi inexistente, sumado a una carente voluntad tanto de entidades como la población, para resolver el apremiante dilema de contaminación ambiental. En este panorama expone la inminencia de que la sociedad encuentre nuevas maneras no solo para reducir la contaminación en el sector agrícola, sino también decodificar las aguas contaminadas, suelos, y el medioambiente.

La respuesta podría encontrarse en el adoptado y ampliamente difundido uso de Microorganismos Eficientes (ME) ya mencionados

anteriormente, para descontaminar los campos, purificar el medioambiente y promover una alta sostenibilidad. Pues, además de acortar ciclos agrícolas, es un método de tratamiento de desechos orgánicos mundialmente validado (Freitag, 2000).

A pesar de su importancia y varios servicios que los microorganismos eficientes de montaña brindan son los menos conocidos y estudiados en nuestra región, donde la falta de investigación y el poco interés por parte de la comunidad científica han dejado de lado la posibilidad de dar inicio a nuevos avances biotecnológicos lo que con lleva a seguir utilizando productos químicos en los diferentes procesos de producción los cuales incrementan la contaminación provocando así un deterioro ambiental y efectos adversos a la salud de los seres vivos..

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Formulación del problema general.

¿Cuál es la determinación de microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarasca en la montaña de la margen derecha del río Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco-2019?

1.2.2. Formulación de los problemas específico:

¿Cuál es el proceso de selección y recolección de las hojarasca del bosque de la margen derecha del río Cozo, Lugar Paccha?

¿Cuál es el procedimiento para elaborar la mezcla de cultivo para los microorganismos eficientes de montaña?

¿Cuál es el procedimiento para aislar microorganismos eficientes de montaña para evaluar su potencial biotecnológico?

¿Cuál es la caracterizar in vitro los microorganismos aislados tanto en forma de consorcios o cepas individuales?

1.3 OBJETIVO GENERAL.

Determinar microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña de la margen derecha del rio Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco - 2019.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Seleccionar y recolectar las hojarascas del bosque de la margen derecha del rio Cozo, Lugar Paccha.

Elaborar la mezcla de cultivo para los microorganismos eficientes de montaña.

Aislar microorganismos eficientes de montaña para describir su potencial biotecnológico.

Caracterizar in vitro los microorganismos aislados tanto en forma de consorcios o cepas individuales.

1.5 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:

Personal

Enmarcado en el objetivo de la Política nacional del Ambiente, de acuerdo al artículo 9° de la Ley N° 28611 Ley General del Ambiente el mismo que menciona “Lograr la conservación y aprovechamiento sostenible del patrimonio natural del país, con eficiencia, equidad y bienestar social, priorizando la gestión integral de los recursos naturales”. Se procede a realizar la siguiente investigación dado que

existen varias herramientas que me permitirán disponer de manera eficiente y accesible de un conjunto de recursos biológicos auténticamente puros y estables, potencialmente aplicables al desarrollo de nuevos productos, a través de esta acción, ampliare mi capacidad técnica y capacidad de interactuar en equipo con personas de otros saberes y de proponer alternativas con argumentación y espíritu de ayuda hacia las personas y a nuestro medio ambiente.

Social

Es de vital importancia realizar este trabajo de investigación ya que al existir estudios referentes a estos microorganismos en nuestra permitirá realizar aislamientos y caracterizaciones a través de técnicas propias con el fin de buscar usos futuros con potencial biotecnológico aprovechando eficientemente las propiedades que poseen estos microorganismos y que puedan proporcionar beneficios a diferentes sectores sociales, ganaderos, agrícolas y alimenticios garantizando la correcta identificación y viabilidad de los microorganismos estudiados. Además de considerar una tecnología natural que no tiene efectos adversos sobre las plantas, animales, seres humanos o el medio ambiente, y de esta manera contribuyendo no solo en los sectores ya mencionada sino también en economía de la población de nuestra región.

Científica

En la presente investigación se determinara los microorganismos eficientes, las cuales si se demuestra en la caracterización que existen microorganismos benéficos, por consiguiente según diferentes

investigadores estos pueden: incrementar el valor nutricional; aumentar la supervivencia y disminuir enfermedades mediante la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas; mantener, mejorar la calidad de suelos y el tratamiento de residuos Agropecuarios, aguas residuales y alimentación animal entre otros (López–Girón, B.A. Colombia 20011). Así también el presente estudio aportara en lo científico una innovadora tecnología en nuestra región para dar el uso sostenible a nuestros recursos naturales y por consiguiente el cuidado del medio ambiente.

1.6 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Una de las limitaciones que se suscitó en el presente trabajo de investigación, es la carencia de información para el tipo de metodología seleccionado para la evaluación de microorganismos eficientes de montaña, en zonas alto andinas. La limitación mayor fue la accesibilidad a las zonas de donde se obtendrán las hojarascas, ya que estos se encuentran en lugares donde el ser humano aún no ha intervenido. A continuación, se muestra el cuadro con las coordenadas de ubicación.

Tabla 1. Coordenadas de ubicación del proyecto

| AREAS | ESTE | NORTE | ALTITUD |
|------------------|-----------|------------|---------|
| AD | | | |
| (AREA DIRECTA) | 349061m E | 8899757m S | 2057 |
| AI | | | |
| (AREA INDIRECTA) | 349052m E | 8899947m S | 2051 |

Fuente: Elaboración Propia.

Acceso a la Zona de estudio

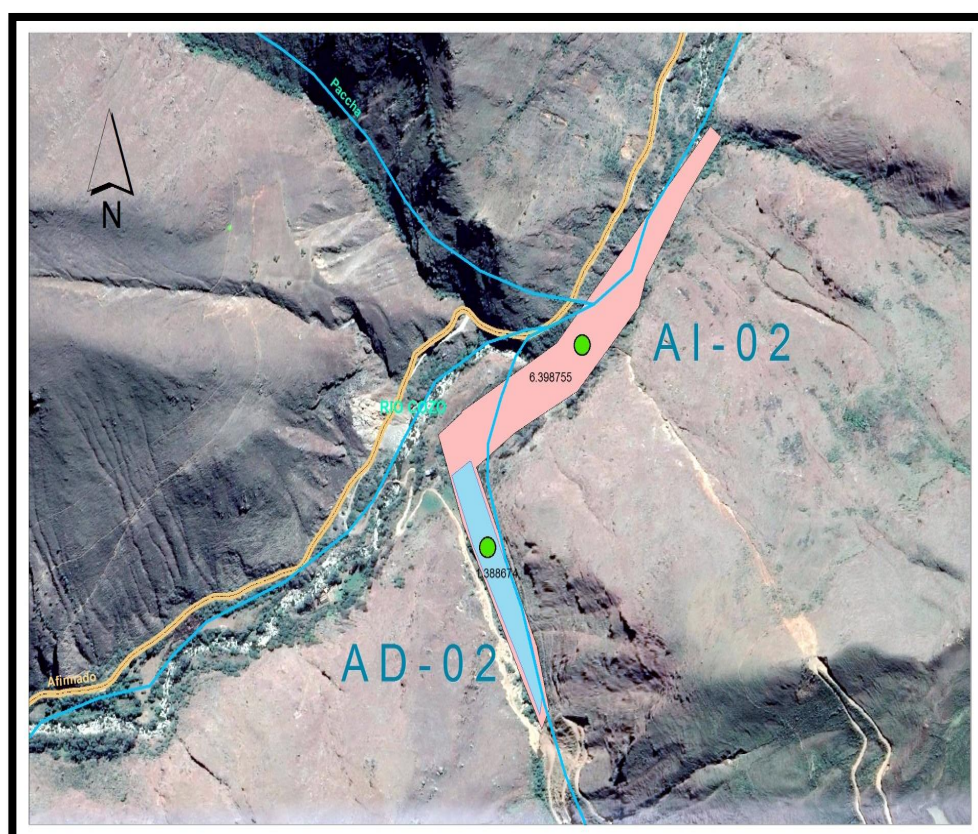


Figura 1. Accesibilidad y área de influencia

Fuente: Elaboración Propia.

1.7 VIABILIDAD DE LA INVESTIGACIÓN

La presente de investigación fue factible por las siguientes razones:

Disponibilidad de recursos financieros, es decir que la tesis se ejecutó por medio de los recursos monetarios propios del investigador por lo que la investigación no requirió de un financiamiento de alguna entidad.

Disponibilidad ética, el desarrollo de la investigación no daño, ni causó alteraciones en el ambiente ni al área de donde se obtuvo los MEM, así mismo el lugar donde se desarrolló la evaluación no sufrió ninguna alteración.

Disponibilidad en tiempo, la presente investigación se realizó en un mediano plazo, aproximadamente de 3 meses dentro del año del 2019.

En la parte técnica, se demostró la facilidad de manejar Microorganismos Eficientes de Montaña con el fin de producir un insumo orgánico de reducido costo económico y ambiental.

En la parte operativa, el manejo resultó sencillo y practico con el fin de que pueda ser desarrollada por agricultores, y población en general quienes tengan acceso a bosques de donde se obtendrán las hojarasca.

En la parte económica, la viabilidad de la investigación resaltó en la obtención de Microorganismos Eficientes sin gastos de alto costo.

En la parte ambiental, el proceso para la obtención de microorganismos eficientes de montaña no causa efectos negativos al medio ambiente, por lo contrario, la aplicación del compost en los cultivos resultante del proceso con MEM, contribuirá como un método alternativo de fertilización, ya que aportan nutrientes de manera progresiva al suelo.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Antecedentes Internacionales:

Orbe.; (2017) Honduras, Desarrollo la investigación, *“Evaluación de la eficiencia de Microorganismos de Montaña (MM) en la Finca Agroecológica Zamorano”*. Este estudio tuvo como **objetivo** evaluar la eficiencia de cuatro dosificaciones de biofertilizante Microorganismos de Montaña (MM) en rábano. **La metodología que utilizo** fue; el diseño experimental usado fue Bloques Completos al Azar BCA 4x4 y análisis estadístico ANOVA de un factor; los **resultados** fueron, el mayor crecimiento foliar, radicular y el peso de bulbo se obtuvo con la dosis T1 (27.20 ml) de biofertilizante. Los resultados son representativos para 1 m² , con ello se estimaron los costos de producción para 20 m² se evidenció que en rábano la dosis T1 (27.20 ml) de biofertilizante genera una producción económicamente viable. En las características químicas del suelo se notaron mínimos cambios en proporciones de pH, macro y micro elementos. La **conclusión** fue: que las dosis empleadas influyeron en el crecimiento del cultivo y en la modificación del suelo. Se recomienda utilizar los Microorganismos de Montaña (MM) en combinación con otros abonos orgánicos para obtener mejores rendimientos y realizar

más estudios en suelos de Zamorano. Se Replicar la metodología de este estudio para evaluar el efecto del biofertilizante MM en el suelo con varios ciclos de cultivo en la Finca Agroecológica Zamorano. Los resultados a obtener se deberán evaluar combinando pruebas de campo con análisis de laboratorio de manera que se puedan comparar con los resultados de este y otros estudios con MM.

Moreno Y Velarde; (2016) Ecuador, desarrollaron un trabajo de investigación que consistía en el *“Aislamiento, caracterización de tierra de montaña y subtrópico el objetivo fue aislar, caracterizar y proyectar los usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico, en los cantones Cumandá y Guano de la provincia de Chimborazo”*.

El **método** consistió en la realizaron una serie de análisis físicos y bioquímicos para identificar algunas variables morfológicas y microbiológicas.

Se obtuvieron como **resultados**: Mediante la técnica de tinción de Gram se lograron identificar algunas bacterias por su forma y coloración que presentaron encontrándose en su mayoría bacilos Gram + y coco bacilos Gram + y Gram - , sometidos a diferentes temperaturas y ambientes aeróbicos y anaeróbicos, también se pudieron encontrar hongos miceliales y algunas levaduras.

En **conclusión** mediante pruebas bioquímicas como el potencial de acidificación y la determinación del uso de carbohidratos se tuvieron como resultado la determinación que las cepas bacterianas aisladas presentan un alto potencial fermentativo por lo que estos microorganismos son muy útiles en la industria principalmente en la agrícola, como activadores de biofertilizantes o abonos orgánicos y en la fermentación de materia orgánica. Se recomienda el estudio a detalle de los hongos para verificar los procesos que estos llevan a cabo, mediante pruebas idóneas para este tipo de microorganismos y aplicar las bacterias aisladas en procesos que involucren principalmente fermentación utilizando sustratos que contengan carbohidratos.

Mendez; (2019) Colombia, en su investigación titulada: *“Evaluación de microorganismos de montaña (mm) como aceleradores de compostaje para la producción de cultivos aromáticos”*, esta investigación se desarrolló con el **objetivo** de evaluar Microorganismos de Montaña (MM) aislados de suelo proveniente de la Finca El Exilio en el Municipio de Tenjo-Cundinamarca y establecer su potencialidad como aceleradores de compostaje y su posterior uso en cultivos aromáticos. La **metodología** que se utilizó fue: se realizó la toma de nueve muestras de suelo constituidas por hojarasca siguiendo el método de muestreo simple al azar, se secaron y tamizaron empleando un tamiz de 1 mm, posterior a esto se hizo la

bioaumentación empleando agua peptonada al 2%. Para la identificación y aislamiento se hicieron diluciones seriadas y se sembró por la técnica de placa vertida. La identificación de especies bacterianas se hizo con pruebas bioquímicas utilizando el equipo Vitek 2.0, para los hongos se hizo caracterización macroscópica y microscópica junto con el uso de claves dicotómicas. Finalmente se llevó a cabo el uso de MM en la producción de compostaje que posteriormente se empleó en cultivos de aromáticas, en este caso: Hierbabuena y Toronjil. Los **resultados y las conclusiones** fueron: la adición de MM en el proceso de compostaje disminuyó el tiempo de degradación de la materia orgánica, al aplicarlo en cultivos de Hierbabuena en proporción 70:30 presentó una diferencia significativa en los niveles de biomasa de la planta, mientras que para individuos de Toronjil se presentó una significancia tanto en biomasa como en la tasa de crecimiento al adicionarlo en proporción 1:100. La adición de MM es una alternativa agroecológica que sirve de insumo en el modelo de agricultura sostenible.

2.1.2. Antecedentes Nacionales:

Recharte; (2015) Abancay, realizó la “*evaluación de microorganismos eficientes autóctonos en el rendimiento del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*, mill)*” el presente trabajo de investigación experimental sostuvo el **objetivo** de evaluar la efectividad de aplicar microorganismos eficientes autóctonos en el rendimiento del cultivo de tomate.

Para conducir el experimento se recurrió a un **método** Por Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA), con un arreglo factorial del tipo $3 \times 3 + 1$ testigo, haciendo un total de 10 tratamientos, con 3 réplicas (incluido el testigo). Los factores evaluados fueron dosis de microorganismos eficientes con 3 niveles de aplicación: 12.5 cc, 25 cc y 50 cc; y las frecuencias de aplicación con 3 niveles: cada 7 días, cada 14 días y cada 21 días. Para evaluar la significancia estadística de los tratamientos se recurrió al análisis de varianza y se realizó la prueba Tukey para determinar cuál de los tratamientos en estudio resultó mejor en comparación del resto.

Los **resultados** obtenidos producto de las aplicaciones de los tratamientos sobre el cultivo de tomate, evidenciaron la existencia de respuestas distintas sobre la altura de la planta, número de tallos, número de flores, área foliar y el rendimiento.

Se **concluye** que la dosis 25 cc con intervalos de aplicación de 14 días, fue la que dio mejores resultados sobre los parámetros agronómicos de las plantas de tomate y permitió alcanzar un rendimiento de 5440.90 kilogramos por hectárea, en comparación con el testigo que alcanzó un rendimiento de 3198.50 kilogramos por hectárea. Finalmente por medio de la descomposición de polinomios ortogonales se determinó la dosis óptima cuyo valor es de 21.15 cc de microorganismos eficientes.

Valdez; (2016) Puno, desarrollo la “*Aplicación de microorganismos eficaces (EM) para el tratamiento de las aguas residuales domesticas en la localidad de Chucuito*”. El trabajo de investigación tuvo como **objetivos**: a) Caracterizar las aguas residuales en sus componentes físicos, químicos y microbiológicos, b) Evaluar el efecto del tratamiento de aguas residuales con aplicación de dosis de microorganismos eficaces (EM) bajo condiciones de laboratorio, c) Comparar el efecto del tratamiento de aguas residuales con la planta de tratamiento y microorganismos eficaces.

Para dar respuesta a los objetivos planteados, se realizó los análisis de parámetros físicos, químicos y microbiológicos en el Afluente y Efluente (PTAR) sin tratamiento y con tratamiento en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Nacional del Altiplano, con muestras tomadas de los baldes experimentales de 20 litros de capacidad, con dosificaciones de 0% (muestra testigo), 1%, 1.5% y 2% de EMa activado, la dosificación se aplicó cada 15 días durante un tiempo de 3 meses para luego realizar la comparación de los dos métodos de tratamiento y determinar cuál de los dos métodos es más eficiente y que cumple con los Límites Máximos Permisibles para los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales domesticas o municipales D.S N° 003 – 2010 – MINAM y Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para agua

conservación del medio ambiente (lagunas, lagos, ríos) D.S N° 015 – 2015 – MINAM.

Los **Resultados** fueron que los microorganismos eficaces (EM), tienen efecto sobre los parámetros físicos, químicos y microbiológicos, después del tratamiento se obtuvo una disminución significativa de pH, con la dosis de aplicación del 2% de EMa de 6.3 - 4.28, en los Solidos Suspendidos totales a medida que paso el tiempo y se aumentó la dosis de aplicación se tuvo efecto aumentando la concentración del parámetro evaluado de 357.48 mg/L (1% EMa), 535.35 mg/L (1.5% EMa) y 727 mg/L (2% EMa), después del tratamiento se obtuvo un aumento de Oxígeno Disuelto, paso de 3.81 mg/L (1% EMa), 3.96 mg/L (1.5% EMa) y 4.12 mg/L (2% EMa), de la misma forma se obtuvo una disminución en cuanto a la Demanda Bioquímica de Oxígeno, de 147.07 mg/L (1% EMa), 131.07 mg/L (1.5% EMa) y finalmente 117.33 mg/L (2% EMa); En cuanto al parámetro de Demanda Química de Oxígeno al igual que el anterior parámetro se tuvo disminución de la misma de 367.67 mg/L (1% EMa), 327.27mg/L (1.5% EMa) y 293. 33 mg/L (2% EMa).

En conclusión se obtuvo que los aceites y Grasas disminuyeron considerable, se obtuvo en todos los tratamiento Ausencia de Película Visible y finalmente en cuanto a los coliformes Termotolerantes se tuvo una disminución considerable de microorganismos patógenos en todos los

tratamientos logrando una remoción del 80.75% en el tratamiento con dosis de aplicación del (2% EMA).

Alvarez; (2018) Lima, realizó el estudio de “*Caracterización de microorganismos benéficos provenientes de tres pisos altitudinales de Azuay - Ecuador y su influencia en el cultivo de fresa*”, el **objetivo** de la investigación fue la caracterización de microorganismos benéficos.

La investigación se realizó en dos **métodos**, de campo y una de laboratorio; la primera etapa de campo se ejecutó en Azuay – Ecuador, se recolectaron muestras de plantas ubicadas en tres pisos altitudinales con características climatológicas diferentes, las dos fases siguientes se cumplieron en la Universidad Nacional Agraria La Molina, en Lima – Perú. En la fase de laboratorio se obtuvieron microorganismos benéficos de cada muestra vegetal, se determinaron las unidades formadoras de colonias de levaduras, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., y actinomicetos, no se confirmó la presencia de *Pseudomonas* spp. Con sistemas miniaturizados API se identificaron *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*; mediante la amplificación 16S-PCR de los lisados de ADN de las cepas en estudio se identificaron *Streptomyces sanglieri*, *Streptomyces lushanensis*, *Streptomyces griseorubens*, *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces bungoensis*. En la segunda etapa de campo se seleccionó un

consorcio microbiano por cada piso altitudinal, se inoculó en el suelo y se plantó fresa.

El los **resultados** se comprobó que de acuerdo a la procedencia los microorganismos presentan diferentes efectos en el suelo y en el desarrollo de las plantas de fresa, el consorcio microbiano obtenido de la planta de café (*Coffea arabica* L.) e inoculado al 2,5% de concentración beneficia el crecimiento radicular así como también incrementan la longitud y diámetro de las plantas, mientras que el consorcio obtenido de la planta de menta (*Mentha piperita*) e inoculado al 2,5% de concentración incrementa el número de hojas.

Se **concluye** que en cada piso altitudinal existen microorganismos benéficos de interés ambiental, que su presencia está ligada a las propiedades fotoquímicas de las especies vegetales y su inoculación provoca cambios en la rizósfera, por lo tanto, benefician el desarrollo vegetativo.

2.1.3. Antecedentes Locales:

Condezo; (2018) Tingo María, desarrollo el trabajo de investigación “*Eficiencia de lactobacillus lactis en la producción de compost a partir de hojas de cacao (theobroma cacao l)*”. El objetivo del presente trabajo fue determinar la eficiencia del *Lactobacillus lactis* en el contenido de nutrientes y el menor tiempo en la producción de compost a partir de hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.), como una alternativa de solución factible

y viable desde el punto de vista económico, social, técnico y ambiental; así como para determinar la influencia que tiene en los parámetros físicos, y el contenido de nutrientes, en la obtención del compost.

Se aplicó la metodología experimental y el diseño utilizado fue completamente aleatorizado, con desigual número de unidades por tratamiento. Muchas veces no es posible tener igual número de repeticiones para todos los tratamientos, hecho que suele ocurrir con relativa frecuencia, cuando el material experimental puede que no alcance por igual para todos los tratamientos (Calzada B 1970).

En la investigación se utilizó dos tratamientos, el tratamiento A con lactobacilos y el B sin este microorganismo eficiente; el tratamiento A tuvo 3 repeticiones y el tratamiento B una sola repetición; se concluye que debido a la poca cantidad de hojas de cacao requeridas que no fue suficiente para cubrir el total de las repeticiones, motivo por el cual el testigo no tiene la cantidad de repeticiones que el tratamiento con *Lactobacillus lactis*.

Huamán; (2015) Naranjillo, desarrollo el estudio de investigación “*Efecto en la aplicación de microorganismos para la transformación de desechos orgánicos en compost en el distrito de Naranjillo*”, el **objetivo** de la investigación fue, evaluar el efecto de los microorganismos capturados en un cultivo de

café orgánico (P1) y en un bosque de tornillo (P2) aplicados en tres (10 D1, 20 D2 y 30 D3 cc/10 l de agua, respectivamente).

Se empleó el diseño experimental de bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial $2 \times 3 + 1$ testigo, con tres repeticiones. Los tratamientos fueron siete, producto de la combinación de los factores en estudio más el testigo que no recibió aplicación de microorganismos. Se efectuó el análisis de variancia (ADEVA), pruebas de significación de Tukey al 5%, para diferenciar entre tratamientos, factor dosis e interacción; pruebas de Diferencia Mínima Significativa al 5% para el factor productos.

La aplicación de los microorganismos en la dosis de 30 cc/l O 1 de agua (D3), causó el mejor efecto en el proceso de descomposición, acelerando el tiempo a la cosecha del compost y obteniéndose mejor calidad en su contenido nutricional, por cuanto los tratamientos que recibieron aplicación de esta dosis reportaron: menor tiempo a la obtención del compost de mejor calidad, obteniéndose en los tratamientos de éste producto: menor tiempo a la obtención del compost (72,33 días), mayor número de colonias de microorganismos aerobios viables con 340×10^4 y según la enumeración de actinomicetos fue de 450×10^4 y la cantidad de mohos y levaduras fue de 50×10^4 de UFC/gr de muestra, con mejor contenido nutricional, al reportar mayor contenido de fósforo (0.777%) y buen contenido de

nitrógeno (1.88%), potasio (2.52%), materia orgánica (35%) y pH (7.77).

En **conclusión**, es un producto apropiado para acelerar la descomposición de los materiales orgánicos, obteniéndose el compost en menor tiempo, con mejor contenido nutricional.

Cajahuanca; (2016) Huánuco, estudio la “*Optimización del manejo de residuos orgánicos por medio de la utilización de microorganismos eficientes (saccharomyces cerevisiae, aspergillus sp., lactobacillus sp.) en el proceso de compostaje en la central hidroeléctrica Chaglla*” el proyecto sostuvo como **objetivo** evaluar una alternativa diferente para la producción de compost a partir del 100% de los residuos orgánicos provenientes de los comedores del campamento de la Central Hidroeléctrica Chaglla por medio de la utilización de Microorganismos Eficientes (EM).

Para lograr dicho objetivo, se **determinó** la cantidad de residuos orgánicos generados y se realizó la caracterización de dichos residuos que van a disposición final, para establecer su posterior tratamiento en compostaje con EM. En la caracterización se hizo la distinción entre la producción de sopa y seco como residuos orgánicos. Así mismo, se realizó el análisis del compost durante y al finalizar el proceso, este seguimiento se hizo mediante pruebas in situ y ex situ para cada tratamiento. Se trabajó con cuatro tratamientos para producción de compost, en los cuales se utilizó la misma cantidad de residuos orgánicos

y aserrín, pero se variaron las dosis de microorganismos eficientes en la conformación de los lotes de compostaje. En el primer tratamiento (testigo), no se utilizaron microorganismos eficientes; para el segundo tratamiento se utilizaron 5 litros del caldo de inoculación (EM); en el tercer tratamiento se utilizaron 10 litros del caldo de inoculación (EM), 5 litros en cada capa del lote (dos capas) y para el cuarto tratamiento se utilizaron 20 litros del caldo de inoculación (EM), 5 litros en cada capa del lote (4 capas). Se construyeron tres lotes para cada uno de los tratamientos. Al terminar el proceso de compostaje se realizó la caracterización a cada lote y se determinó que la mejor alternativa para la producción de compost en la Central Hidroeléctrica Chaglla, teniendo en cuenta la calidad del compost, los costos de inversión y mantenimiento, fue la de del cuarto tratamiento con EM.

Por medio del seguimiento a la variación de temperatura, se evidenciaron las fases del proceso de compostaje, a saber: hemofílico, termofílica (en los que presentaron), de enfriamiento y maduración. Dado a que los lotes del proyecto eran de dimensiones relativamente grandes, se alcanzaron temperaturas extremas. Así, por ejemplo, la máxima temperatura alcanzada fue de 69.5°C. Después de 32 días se daba por terminado el proceso de compostaje. Se determinó la producción final de compost en peso y volumen, obteniendo mejores resultados en los lotes del cuarto tratamiento con EM.

Finalmente se enviaron muestras al Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional Agraria la Molina para determinar las características químicas finales del compost obtenido en cada tratamiento. Tales pruebas fueron C/N, Materia Orgánica, Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio y Magnesio.

Ya teniendo los **resultados** de análisis de las muestras, se hizo la respectiva comparación con la Norma de Calidad de Compost del Instituto Nacional de Normalización de Chile (Alcazar, 2004); para evaluar en que rango se encuentra (Clase A, Clase B o Inmaduro) para su posterior recomendación del uso del compost obtenido en cada tratamiento para uso hortícola.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Biotecnología

La biotecnología es una ciencia multidisciplinaria que abarca disciplinas como biología, bioquímica, agronomía, virología, medicina, ingeniería química y genética; la misma que busca intervenir en la producción de bienes, servicios o conocimientos para la humanidad innovando en algún nivel del campo industrial científico o productivo como lo menciona Roldan y Yeste. Esta disciplina se lo aprovecha en la agricultura, ganadería, farmacia, tecnologías de alimentos medioambiente, entre otros.

De este modo redefinimos a la Biotecnología, como una amplia área del conocimiento moderno que combina de manera innovadora la biología y la ingeniería en procesos que, aplicados

sobre organismos vivos, sus tejidos, células o partes generan bienes, servicios o conocimientos que promoverán el bienestar de la humanidad (Hernández,2010)

De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2010, citado en <http://www.fao.org/biotechnology/es/>) la biotecnología moderna contribuye a la agricultura grandes y variados beneficios de una manera rápida y en cantidades mayores, así como nuevas diversidades de plantas capaces de tolerar condiciones adversas, resistir herbicidas y plagas mejorando sus propiedades alimentarias y sanitarias y de esta manera enfocarse en la preservación del medio ambiente.

En el Perú, la biotecnología se encuentra en un período de desarrollo inicial, por eso es importante formar personas con conocimientos concretos en esta área para que puedan lograr un mayor y mejor progreso de la biotecnología en nuestro país.

2.2.2. Microorganismos eficientes

Origen de Microorganismos Eficientes

Los microorganismo eficiente (EM) fue desarrollado por el Dr. Teuro Higa estudiando las funciones individuales de diferentes microorganismos, encontrando resultados positivos en esta mezcla, desde entonces esta tecnología ha sido investigada, desarrollada con el fin de incrementar los microorganismos benéficos y la diversidad microbiana del suelo, y a su vez,

aumentar el crecimiento, producción y calidad de los cultivos según lo indica (Enríquez y Viera 2010)

EM es la abreviatura mediante la cual se puede reconocer a los microorganismos eficientes de origen natural sin manipulación genética, los mismos que forman un exuberante grupo de microorganismos existentes en los ecosistemas naturales donde no ha existido aún actividad humana, siendo así seleccionados por sus beneficios y compatibilidad en cultivos mixtos.

Formación y Composición de Microorganismos Eficientes

Como lo señala Enríquez y Viera (2010) los microorganismos eficientes (EM), es una mezcla de varios microorganismos benéficos, tanto aeróbicos como anaeróbicos.

Entre estos se encuentran bacterias ácido láctico y fotosintético, levaduras, hongos como los actinomicetos y hongos fermentadores. Estos microorganismos existen en gran cantidad en la naturaleza y son usados para el procesamiento de alimentos y de comida animal fermentada. Son totalmente seguros para los seres humanos y animales.

Bacterias fotosintéticas (*Rhodopseudomonas* spp), Son un grupo de microorganismos que sintetizan sustancias útiles (aminoácidos, ácidos nucleicos, compuestos bioactivos y azúcares), a partir de las secreciones de las raíces y la materia orgánica, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Son consideradas el eje central de la actividad del EM, pues dan sostén a otros microorganismos, también coexisten con *Azotobacter* y *Rhizobium*, que fijan nitrógeno atmosférico.

Bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus* spp), Originan ácido láctico a partir de azúcares y otros carbohidratos, producidos por las bacterias fotosintéticas y levaduras. Los *Lactobacillus* promueven la fermentación y desdoblamiento de lignina y celulosa, permitiendo una más rápida descomposición de los materiales vegetales. También, tienen la habilidad de suprimir microorganismos causantes de enfermedades, como los hongos del género *Fusarium*, que debilitan las plantas, exponiéndolas al ataque de otras enfermedades y plagas.

Levaduras (*Saccharomyces* spp), Sintetizan tanto sustancias antimicrobiales, como compuestos útiles para el crecimiento de las plantas, partiendo de aminoácidos y azúcares (secretados por las bacterias fotosintéticas), así como de materia orgánica. Los elementos producidos por las levaduras (hormonas y enzimas), promueven la división activa de células, siendo también, sustratos útiles para las bacterias ácido lácticas y los actinomicetos.

Principales fuentes de Microorganismos Eficientes.

Enríquez y Viera (2010), establece que hay al menos cinco grandes fuentes de microorganismos benéficos utilizables en agricultura entre ellos se encuentran:

Mantillos. La fuente primaria de microorganismos benéficos agrícolas se encuentra en el litter, mantillo o tierra de capote o primera película de tierra bajo la hojarasca y material desprendido de las selvas y bosques o de algunos agrosistemas poli estratificados, es decir, bajo sombrío de árboles. Esta primera capa de tierra es a la vez efecto y residencia de los microorganismos que, vehiculizados en el humus, convierten los residuos de vegetación y fauna en tierra fértil. Numerosas culturas antiguas han utilizado el mantillo como abono natural.

Compost. Diversas escuelas alternativas se aproximan al humus a través de diversos mecanismos, particularmente los compost y muy especialmente los lumbricompost; en estos últimos las excretas de las lombrices son resultado del complejo microbial digestivo.

Caldos microbiales. Se trata de la multiplicación por vía líquida de microorganismos benéficos, de los cuales los cuatro grupos más cultivados son: bacterias foto sintetizadoras, llamadas algas unicelulares, levaduras, lactobacilos, actinomicetos.

Micorrizas. Tienen un papel importante en el comportamiento del árbol, por aumentar la capacidad de absorción de los elementos nutritivos, al producir nuevas ramificaciones absorbentes y aumentar el área de contacto de la raíz con el suelo.

La función principal de las micorrizas es ayudar a que los nutrientes del suelo sean absorbidos fácilmente por las plantas

ya cambio las plantas le suministran carbohidratos esenciales en la vida del hongo.

2.2.3. Microorganismos de tierra de montaña.

Los microorganismos de tierra de montaña son una combinación de microorganismos que se encuentran en ecosistemas o entornos naturales, los mismos que pueden ser aplicados como inoculantes para ayudar a mejorar los suelos y el rendimiento de los cultivos.

Según Paniagua (*et al.*, 2008), estos microorganismos son capaces de descomponer la materia orgánica, a su vez compiten con los microorganismos dañinos. Reciclan los nutrientes para las plantas. Fijan el nitrógeno en el suelo. Degradan las sustancias tóxicas (pesticidas). Producen sustancias y componentes naturales que mejoran la textura del suelo.

Hace algunos años esta tecnología fue desarrollada con el fin de reproducir estos microorganismos que se encuentran de manera natural en la capa superficial y orgánica de los suelos en los bosques no manipulados por el hombre. Estos microorganismos MM tienen múltiples beneficios: bajos costos y de fácil implementación, cumplen un papel fundamental en los procesos biológicos de los suelos principalmente en los sistemas agrícolas.

Los microorganismos de montaña son un grupo de organismos beneficiosos los cuales contienen aproximadamente 80 especies de microorganismos pertenecientes básicamente a cuatro géneros principales: bacterias fotosintéticas, actinomicetos, bacterias productoras de ácido láctico y hongos de fermentación.

En estos ecosistemas se genera una descomposición de materia orgánica, que se convierte en los nutrientes necesarios para el desarrollo de su flora, por ejemplo, cerros, bosques mixtos, y latifoliados, plantaciones de café, plantaciones de bambú, entre otros. (Suchini, 2012; citado en Monjarás, 2016b).

Funciones de los microorganismos de montaña:

Según Castro, (2015) los microorganismos de montaña MM cumplen las siguientes funciones:

- Tienen la capacidad de degradar la materia orgánica incrementando la disponibilidad de los nutrientes del suelo.
- Ayudan a controlar los microorganismos patógenos que se encuentran en el suelo.
- Favorecen la degradación de sustancias tóxicas como los plaguicidas, mejorando de esta manera la fertilidad de los suelos.
- Aceleran la germinación de las semillas.
- Fijación del nitrógeno en el suelo, entre otras.

2.2.4. Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos eficientes.

Hoy en día las aplicaciones biotecnológicas de microorganismos eficientes son diversas e innovadoras ya que tienen como aporte no solo económico y energético sino ambiental. Dentro de los campos en donde se aplica biotecnológicamente los microorganismos está la producción de biocombustible, la agricultura, ganadería, industria e incluso en la salud humana facilitando una coexistencia más armónica entre los microorganismos y la humanidad. *Wood* (2009: citado en Acosta, 2012).

En la agricultura, Los microorganismos eficientes se han utilizado para enriquecer el suelo y producir cultivos de calidad, sanos, con un mayor rendimiento, con menos enfermedades o plagas sin el uso de productos químicos agrícolas. Los biofertilizantes o abonos biológicos están basados en microorganismos que promueven y benefician la nutrición y el crecimiento de las plantas. Se trata de microorganismos del suelo, generalmente hongos y bacterias, que se asocian de manera natural a las raíces de las plantas de una forma más o menos íntima. Estos microorganismos pueden facilitar de manera directa o indirecta, la disponibilidad de determinados nutrientes tales como: el nitrógeno, el fósforo y el agua, además de producir sustancias denominadas fitohormonas promotoras del crecimiento vegetal.

Como manifiesta *Palazón (2015)* utilización de microorganismos con capacidad para promover el crecimiento de las plantas, se presenta como una gran alternativa de biofertilización. Estudios controlados de laboratorio, invernadero, y de forma más natural en el campo, han demostrado que la aplicación de estas tecnologías redunda en claros beneficios.

Efectos positivos

- Promueve la germinación, crecimiento, florecimiento, fructificación y maduración de las plantas cultivadas.
- Realiza la capacidad fotosintética de las plantas.
- Incrementa la eficiencia de la materia orgánica como fertilizante.
- Desarrolla resistencia de las plantas a plagas y enfermedades.
- Mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo suprime patógenos y plagas del suelo.

(Web master, 2009)

En la ganadería, Se ha utilizado para disminuir malos olores, reducir plagas de insectos y enfermedades, así como para aumentar la fecundidad de la inseminación artificial, y mejorar la calidad de la carne, lácteos y huevos.

En la conservación del ambiente, Limpiar aguas contaminadas en estanques, lagos, presas y costas, incluyendo en la limpieza de derrames de petróleo, en el tratamiento de aguas residuales, y en la transformación de residuos orgánicos en abonos de calidad. Los beneficios en el tratamiento de agua son:

- Promueve significativamente la reducción olores del sistema.
- Ayuda a neutralizar la producción de gases nocivos como amoníaco, sulfhídrico y metilmeacarptano.
- Reduce el lodo sedimentado.
- Reduce la presencia de microorganismos patógenos, coliformes, bacterias nocivas, hormonas y sulfatos reductores.
- Mejora significativamente la calidad del agua, reduciendo la DBO a DQO, la turbidez, los suspensos y, equilibra el pH y el oxígeno disuelto. (AMBIEM, 2010)

Otra aplicación de gran importancia que tienen los microorganismos es ser fuente de generación de energía alternativa para cultivos la misma que no inicia en la agroindustria, es decir, en los lugares de procesamiento de sustratos, sino en la producción de buena parte de ellos (cultivos de: palma, caña, maíz, yuca, caña, papa, cereales, etc.).

La revolución verde, obligó al uso excesivo de productos químicos para la producción de los cultivos, lo que ha causado

detrimento ambiental y productivo. Con este enfoque se rompió el equilibrio edáfico entre la solución nutritiva del suelo y la población nativa de microorganismos. Las deficiencias nutricionales en los cultivos se trataban únicas y exclusivamente con fuentes inorgánicas, exceptuando claro el empleo de materia orgánica que para la fecha no era de buena calidad y se convirtió en el nicho de patógenos como nematodos, bacterias y hongos nocivos para las plantas. Podría decirse entonces que las primeras usuarias o beneficiarias de la microbiotecnología son las plantas mismas, pues reciben alimento (energía) de su vínculo (a simbiótico o simbiótico) con los microorganismos nativos e inoculados por el hombre, como fuente alternativa de energía, diferente a la convencional o de origen químico. Se ha demostrado que el uso de microorganismos en la agricultura favorece el desarrollo de los cultivos, disminuye los impactos nocivos del manejo de los cultivos, constituye una fuente renovable de energía para los mismos y son más baratos. (Fundación GEA, 2012)

2.2.5. Metodologías de aislamiento

La técnica de aislamiento bacteriano es muy utilizada en el laboratorio para transferir un microorganismo proveniente de una muestra de un ambiente a otro con el propósito de promover su crecimiento y posteriormente poder identificar los microorganismos aislados, en la tabla 2 se muestran algunas de las técnicas de aislamiento utilizando siempre un medio de cultivo sólido.

Tabla 2. *Métodos De Aislamiento Frecuentes*

| Tipo de Siembra | Mecanismo | Técnica |
|-----------------------------------|--|---|
| Agotamiento por estrías | Agotamiento progresivo y Continuo del inóculo. | Consiste en realizar múltiples estriados en el medio sólido en diferentes secciones, tomando en cada rayado solo la muestra de la sección anterior. |
| Diseminación en superficie | Extensión múltiple del inóculo | Se extiende con una espátula de siembra una mínima cantidad de muestra (50µL) rotando múltiples veces el medio sólido. |
| Diluciones seriadas | Dilución sucesiva del inóculo. | Consiste en realizar diluciones graduales de la muestra con la finalidad de sembrar la menor cantidad de colonias en el medio sólido. |

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Metodologías de Caracterización

Características Microscópicas

El estudio microscópico para la identificación de una gran mayoría de grupos bacterianos nos permite determinar la forma, tamaño y la estructura de las células realizando tinciones principalmente la tinción de Gram; mediante la cual se puede identificar si son bacterias Gram positivas por su coloración azul o violeta o bacterias Gram negativas por su coloración rosa o roja.

Características Macroscópicas

Morfología, Permite determinar la morfología para identificar las colonias bacterianas para lo cual se requiere un cultivo puro, es decir que provenga de una misma célula y que además esté compuesta únicamente por un solo tipo de microorganismo. Cuando las colonias poseen todos los requerimientos necesarios de nutrientes de temperatura, etc. se las puede visualizar fácilmente por presentar ciertas características en cuanto a la forma, tamaño, color que muestran las colonias.

Además, las colonias presentan cierta característica en cuanto a su textura, algunas pueden ser viscosas, así como secas, presentar superficies lisas o granulares.

Características de crecimiento

Según Koneman, (2016a, p. 164) los microorganismos presentan ciertas características de crecimiento como:

- a) *Rapidez de crecimiento.*- la mayoría de los microorganismos aislados en el laboratorio se desarrollan dentro de 1 a 2 días. Sin embargo, ciertas bacterias (p.ej., actinomicetos, micobacterias) y hongos pueden tomar un tiempo considerablemente más largo.
- b) *Morfología de las colonias en el medio de crecimiento.*- las bacterias varían en su aspecto en medios de cultivos sólidos. Con experiencia la morfología de las colonias en varios medios acoplada con algunas pruebas rápidas (p.ej., oxidasa, catalasa) a menudo es suficiente para la caracterización del género de microorganismos que se desarrollan a partir de muestras.
- c) *Condiciones atmosféricas óptimas para el desarrollo.* - los microorganismos se pueden caracterizar por sus requerimientos para el oxígeno y, según ese requerimiento, se pueden clasificar como aerobios (requieren oxígeno), facultativos (pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno) o anaerobios (crecimiento óptimo en ausencia de oxígeno). El crecimiento de la mayoría de los microorganismos también se estimula por dióxido de carbono y el crecimiento de los capnófilos depende del CO₂.

- d) *Temperatura óptima de crecimiento.*- la mayoría de los microorganismos aislados en los laboratorios tienen un desarrollo óptimo a 35 – 37 °C. La capacidad para crecer a varias temperaturas puede ser útil para caracterizar algunos microorganismos.
- e) *Morfología de las colonias en medios diferenciales, selectivos y no selectivos.*- Los laboratorios inoculan muestras en medios no selectivos y selectivos para lograr las condiciones óptimas de aislamientos de microorganismos a partir de una muestra. Los medios selectivos usan agentes antimicrobianos (colistina, ácido nalidixico en agar o colorantes, agar de Macconkey, agar de azul de metileno- eosina) para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos y permitir el de otros. (Koneman, 2016b, p. 164).

2.2.6. Base legal.

El presente trabajo de investigación tiene como como único sustento legal el objetivo de la Política Nacional del Ambiente, de acuerdo al artículo 9° de la Ley N° 28611 Ley General del Ambiente el mismo que menciona “Lograr la conservación y aprovechamiento sostenible del patrimonio natural del país, con eficiencia, equidad y bienestar social, priorizando la gestión integral de los recursos naturales”

2.3. DEFINICIONES CONCEPTUALES:

Hojarasca: Este término hace referencia a las hojas que han caído de los árboles y cubren el suelo. Las hojas caídas alimentan el suelo del bosque, ya que generan humus y nutrientes que son recuperados por ellos mismos. Gracias a ellas se retornan al suelo los bioelementos necesarios para mantener su productividad. Además proporcionan alimento a los organismos contenidos allí.

Microorganismos Eficientes: Los ME (o EM, por sus siglas en inglés) fueron descubiertos por el Dr. Teruo Higa, un microbiólogo y agricultor orgánico de la Universidad del Ryukyus en Okinawa, Japón, quien hizo una observación accidental mientras buscaba los variados aspectos benéficos de aislar cepas de microorganismos en la composición del suelo y el crecimiento de las plantas.

Mantillos. La fuente primaria de microorganismos benéficos agrícolas se encuentra en el litter, mantillo o tierra de capote o primera película de tierra bajo la hojarasca y material desprendido de las selvas y bosques o de algunos agros sistemas poli estratificados, es decir, bajo sombrío de árboles. Esta primera capa de tierra es a la vez efecto y residencia de los microorganismos que, vehiculizados en el humus, convierten los residuos de vegetación y fauna en tierra fértil. Numerosas culturas antiguas han utilizado el mantillo como abono natural. Enríquez y Viera (2010e).

Microorganismos de Tierra de Montaña. Los microorganismos de tierra de montaña son una combinación de microorganismos que se

encuentran en ecosistemas o entornos naturales, los mismos que pueden ser aplicados como inoculantes para ayudar a mejorar los suelos y el rendimiento de los cultivos. Según Paniagua (et al., 2008).

2.4. VARIABLES

2.4.1. Variable independiente (X):

X1: Microorganismos Eficientes.

2.4.2. Variable dependiente (Y):

Y1: Hojarascas.

2.5. Hipótesis

H_i: Se determinará los microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña.

H_o: No se determinará los microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña.

CAPÍTULO III

MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

3.1.1. La Enfoque de la investigación.

El enfoque es Mixto, debido a que combino componentes cualitativos y cuantitativos en la investigación ejecutada. Este enfoque se desarrolla a partir de dos variables correlacionados, complementándose en la práctica. Mezcla trabajo en equipo de datos, teorías, disciplinas, diseños, métodos, etc. La recolección y análisis de información se realizan mediante datos cuantitativos y cualitativos. (Hernández, 2016).

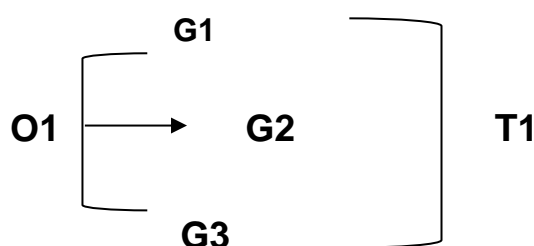
En el presente trabajo se aplicó un enfoque cuantitativo porque realizo el recuento de colonias, y es cualitativa porque se determinó los microorganismos eficientes de montaña en el laboratorio de microbiología del Hospital Materno Infantil “Carlos Showin Ferri”.

3.1.2. Alcance o nivel de investigación.

El presente estudio tiene un nivel descriptivo ya que se busca describir las características del objeto de investigación (finalidad cognoscitiva), el análisis estadístico es univariado, nos permite estimar parámetros (propósito estadístico) en la población de estudio a partir de una muestra. (Supo, 2014).

3.1.3. Diseño de la Investigación.

El presente estudio siguió un diseño sin intervención, prospectivo, transversal. Recolectan datos a través del tiempo en puntos o periodos específicos para hacer inferencias respecto al cambio, determinantes y consecuencias. Descriptivo (Supo, 2014). Y se ilustra de la siguiente manera:



Se utilizó el Diseño Completo al Azar (DCA) para fines de obtención de muestra; solo con una muestra analizada; de los diferentes tubos de ensayo se utilizó 1 ml de solución que se aplicó en placas Petri con medios de cultivo específicos (tabla 3) positivos para los microorganismos, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., actinomicetos y *Pseudomonas* spp.

Tabla 3. Medios de cultivos específicos

| Medio de cultivo | Microorganismo |
|------------------|---------------------------|
| Agar Sabouraud | Levadura |
| Agar Nutritivo | <i>Bacillus</i> spp. |
| Agar Rogosa | <i>Lactobacillus</i> spp. |
| Agar Avena | Actinomicetos |
| Agar Cetrimide | <i>Pseudomonas</i> spp. |

Fuente: Elaboración propia

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

En la presente investigación se consideró toda población de hojarasca que fue recolectada de la zona denominada Pacha cabe recalcar que esta población de vegetación está constituida en su gran mayoría por el *Alnus glutinosa*.

3.2.2 Muestra

La muestra está constituida por dos sacos de 25 kg cada uno que hacen un total de 50kg de hojarasca extraída de la zona. De esta cantidad se procedió a realizar el cultivo para la extracción de microorganismos benéficos para lo cual solo se analizó solo una disolución de 10^{-6} ya que según mi criterio como investigador solo estamos analizando los MEM de un solo punto de evaluación, obtenidos dentro de la zona de bosques del lugar denominado pachca de las inmediaciones de la margen derecha del río Cozo.

Lugar de muestreo

El lugar de muestreo y recolección de hojarascas, se encuentra ubicado al norte de la provincia de Huánuco, a una hora de la misma ciudad. La zona denominada como Paccha se sitúa en una altitud que varía de 2200 msnm aproximadamente, esta situación permite que sea una zona con considerable biodiversidad de la provincia.

Está ubicada con un clima templado que tiene una temperatura promedio de 20° C. El proyecto se realizara específicamente en la Margen derecha del rio Cozo de la zona denominada como Paccha, de donde se tomaran puntos de muestreo que se indican en el cuadro 3.

Tabla 4. *Ubicación del punto de muestreo en la margen derecha del rio Cozo*

| PUNTOS DE MUESTREO | ESTE | NORTE |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| PM1 | 349061m E | 8899757m S |

Fuente: Georreferenciación GPS.

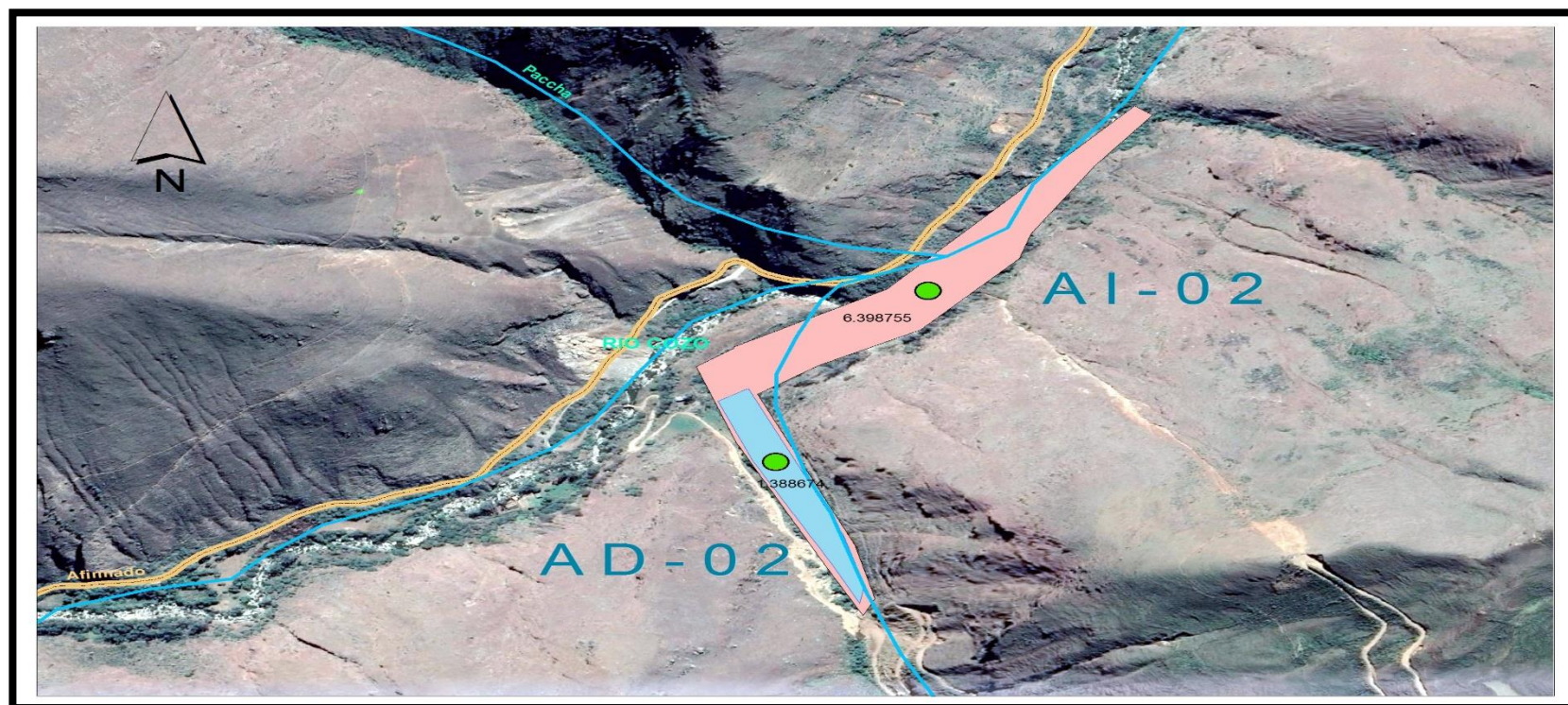


Figura 2. Ubicación del lugar de recolección de hojarascas.

Fuente: Google Earth.

La presente investigación tuvo como punto de recolección de las hojarascas en la margen derecha del rio Cozo zona Paccha y lugar para el análisis microbiológico fue el laboratorio de microbiología del Hospital Materno Infantil “Carlos Showin Ferrari” – Huánuco.

3.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

3.3.1 Para la Recolección de Datos

Para la recolección de datos:

Aislamiento de microorganismos eficientes de montaña

A. Georeferenciación de los lugares de muestreo

Se realizó las visitas al respectivo lugar de estudio para localizar los puntos donde se tomaron las muestras para lo cual se tomó a consideración un sitio geográfico plenamente identificado como es la margen derecha del río Cozo (tierra de montaña) de los cuales se realizarán la recolección de hojarasca y capturas de los microorganismos.

Primeramente, se procedió a aislar y reproducir los MEM de la procedencia de las inmediaciones de la margen derecha del río Cozo, para lo cual se escogió el siguiente medio de crecimiento.

B. Preparación y cultivo de microorganismos

La hojarasca fueron mezclados con las fuentes de energía según correspondiera, y llevadas a una humedad del 35%. Se almacenara el lote en un bidón de plástico bajo condiciones de anaerobiosis durante cuatro semanas.

La metodología que se tomó como referencia para la elaboración de la mezcla del cultivo de los MEM fue: **Experimento en el Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica (CNEAO-INA)**

Tabla 5. Insumos para la producción de MEM

| MATERIALES | CANTIDAD/TOTAL |
|------------|---|
| Hojasasca | 2 saco |
| Semolina | 1 saco (50lb) |
| Melaza | 2 galones diluidos en 1 litro agua (sin cloro) |

Fuente: Elaboración propia.

C. Aislamiento de microorganismos mediante cultivos genéricos.

Preparación de medios de cultivo

Se preparó los cinco medios de cultivos:

- Agar Sabouraud Levadura
- Agar Nutritivo Bacillus spp.
- Agar Rogosa Lactobacillus spp.
- Agar Avena Actinomicetos
- Agar Cetrimide Pseudomonas spp.

Preparación de las diluciones

Procedimiento:

1. Se tomó a consideración solo una muestra porque únicamente tendremos un punto elegido.
2. Se preparó varios tubos de ensayo los cuales contendrán 9 ml de agua esterilizada.
3. Se pesó 1 g de la muestra.
4. Se realizó diluciones seriadas de las muestras hasta llegar a una dilución de 10^{-6} , se debe tomar en cuenta que la primera

dilución 10^{-1} contiene 1 g de la muestra original y 9 ml de agua estéril.

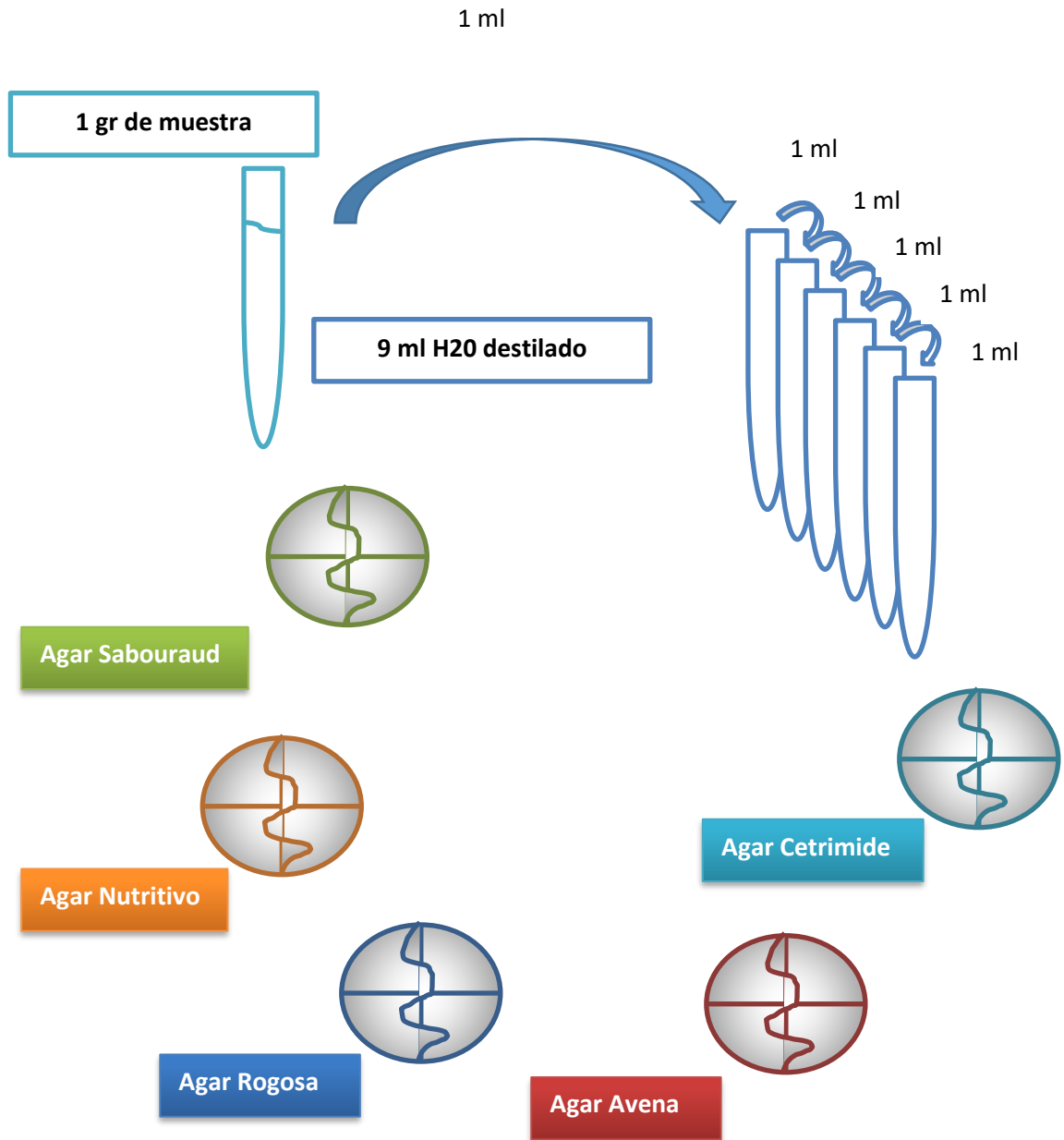


Figura 3. Procedimiento para la preparación de diluciones

5. Se debe homogenizar la muestra por 60 segundos y posteriormente se realiza la misma técnica hasta llegar a una dilución 10^{-6} .

c. Siembra de las diluciones

De la dilución 10^{-6} se tomó 1 ml de la solución y se sembró en una caja Petri que contiene el medio de cultivo preparado anteriormente y se esparce suavemente en la superficie del medio. Todo debe estar debidamente rotulado para saber a qué muestra pertenece cada caja.

En el caso de hongos y levaduras se incubará las cajas Petri a 27°C por un periodo de 48 a 72 horas para verificar el crecimiento.

Cultivo para bacterias

Para bacterias se lo colocará en la estufa a 37°C por 24 horas.

Transcurrido el periodo de incubación se realizará la caracterización de colonias en cada placa con el fin de determinar el número de microorganismos en la muestra inicial.

Para el reporte de los resultados se usó la siguiente fórmula.

Caracterización in vitro de los microorganismos aislados

Identificación de los grupos morfológicos a través de tinción

Gram.

Para la determinación de la morfología de los microorganismos incubados en los medios selectivos se utilizó la técnica de coloración o tinción Gram como se describe a continuación:


1. Se tomó directamente de la caja Petri una muestra significativa con asa de glaski; se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se extiende por la superficie.
2. Flameamos la muestra con ayuda de un mechero para que se quede completamente seco.
3. Se coloca los reactivos de tinción primero el cristal violeta durante 1 minuto; inmediatamente se lava y se coloca Lugol durante 1 minuto y se lava nuevamente; seguido se expone a alcohol cetona durante 1 minuto y se vuelve a lavar; finalmente se colocara safranina y se lava.
4. Posteriormente se coloca una gota de aceite de inmersión en la placa y se observara en el microscopio con el objetivo (100x); donde se podrán diferenciar las colonias Gram + de color azul y las colonias Gram – de color rojo. Esto se da gracias a que el Lugol lava el polisacárido de la pared de las bacterias Gram – y estas quedan incoloras, mientras que las bacterias Gram + conservan el tono azulado.




Posteriormente la Safranina entra en contacto con las bacterias. Gram – y les da el tono rojizo.

CAPITULO IV

RESULTADOS

SELECCIÓN Y RECOLECCIÓN DE HOJARASCAS DEL BOSQUE DE LA MARGEN DERECHA DEL RIO COZO, LUGAR DENOMINADO PACCHA



| OPERACIÓN O PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR ES BAJO CONTROL | EVIDENCIAS |
|---|--|---|--|--|--|
| Acción del lugar para recolectar hojarascas. | Se seleccionó el lugar denominado Paccha, como punto de recolección de los microorganismos de montaña, ya que esta zona posee las condiciones naturales que dan origen a estos microorganismos presentes en tierra, hojas secas y troncos en descomposición, porque en esta zona según información recolectados por los pobladores cercanos al lugar en los últimos años no se ha utilizado agro-químicos, las condiciones físico naturales son similares a las del lugar donde se realizó el experimento, permitiendo esto tener un alto nivel de adaptabilidad de los microorganismos al momento de realizar y aplicar el cultivo. | Seleccionó el lugar con las condiciones físico naturales similares a las del lugar donde se realizó el experimento, permitiendo esto tener un alto nivel de adaptabilidad de los microorganismos al momento de realizar y aplicar el cultivo. | El trabajo tuvo una duración de 2 horas. | Información proveniente de los pobladores cercanos a la zona |  |




| OPERACIÓN O PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR ES BAJO CONTROL | EVIDENCIAS |
|--------------------------------------|--|--|---|---|---|
| Visita al bosque. | Se visitó el bosque del lugar denominado Paccha (10/09/2019), el cual se seleccionó bajo la orientación de los pobladores cercanos al lugar, uno de los elementos que se tomó en cuenta fue su acceso, que es el de más baja complejidad del sitio, permitiendo esto un fácil transporte de los sacos de hojarasca recolectados. | Corroborar in-situ la existencia de hojarasca en descomposición. | Tiempo de recorrido fue de 20 minutos, Huanuco-Cozo. | La presencia de hojas con color blanquecino |  |
| Selección y Recolección de hojarasca | <p>Se seleccionó y recolectó la hojarasca que cumplió con las características de los microorganismos mediante inspección directa ya que la materia en descomposición se caracteriza por tener un color blanquecino; así también se recolectaron la hojarasca y troncos o restos de árboles caídos.</p> <p>Cabe resaltar que al momento del contacto directo con el bosque la mayoría de la vegetación fue de Aliso <i>Alnus glutinosa</i>.</p> <p>Se recolectaron dos sacos de hojarasca, los que se trasladaron a un lugar con las condiciones adecuadas, donde se elaboró el cultivo para la reproducción de los MEM.</p> | Encontrar los microorganismos eficientes de montaña. | La recolección de muestras fue un periodo de 3 horas. | Exposición a agentes externos que puedan contaminar la muestra. |   |

ELABORACIÓN DE LA MEZCLA DEL CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS EFICIENTES DE MONTAÑA

La metodología que se tomó como referencia para la elaboración de la mezcla del cultivo de




Los MEM fue la de: Experimento en el Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica (CNEAO-INA).



| OPERACIÓN O PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR ES BAJO CONTROL | EVIDENCIAS |
|---|--|--|--|---|--|
| Extensión de plástico y selección de hojas. | Se extendió el plástico negro, se limpió con agua hervida, para seleccionar las hojas y los troncos, las ramas grandes y material extraño que no beneficiarían a la reproducción de los microorganismos; a continuación se procedió a triturar y dejar listo para proseguir con el siguiente paso. | No alterar los resultados del cultivo, | El tiempo de duración fue de 20 minutos. | Contacto con agentes externos que puedan contaminar la muestra. |  |
| Aplicación de la cascarilla de arroz | Posteriormente se aplicó la cascarilla de arroz, se mezcló con la hojarasca con mucho cuidado para dar uniformidad a la mezcla. . El polvillo de arroz aporta nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (Restrepo, 1996). | Favorecer en alto grado la fermentación de la mezcla y que es incrementada por el contenido de calorías que proporcionan a los microorganismos | La aplicación de la cascarilla de arroz tuvo una duración de 15 minutos. | Uniformidad de mezcla. |  |


| OPERACIÓN O PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR ES BAJO CONTROL | EVIDENCIAS |
|--|--|--|---|---------------------------|--|
| Disolución de melaza en agua y su aplicación | Se disolvieron los dos galones de melaza en un galón de agua sin cloro que se trajo de la quebrada de la misma zona, para una mejor distribución de la melaza en la mezcla, se aplicó de manera manual. La melaza es rica en potasio, calcio, magnesio y contiene micronutrientes, como el boro (terapias naturales, 2009) | Aportar la principal fuente de energía a los microorganismos que participan en la fermentación del cultivo, favoreciendo la actividad microbiológica. | Aplicación de la disolución de la melaza en la mezcla fue durante 30 minutos. | Humedad |  |
| Mezclado de los ingredientes y llenado del bidón | Se mezclaron todos los ingredientes para el cultivo y reproducción de microorganismos de manera manual para una mejor uniformidad, obteniendo un olor agradable, posterior a esto se realizó el llenado del barril con la ayuda de una pala. | El propósito de esta operación es poder mantener una uniformidad de mezcla. | El tiempo que duro esta operación fue de 30 minutos | Uniformidad de mezcla |  |
| Compactación de la mezcla en el barril | Se compactó con un listón de madera (apisonando) con un aproximado de 40 cm desde la tapa del barril hasta la superficie de la mezcla | Evitar acumulación de aire ya que este proceso es anaerobio para evitar la proliferación de microorganismos desfavorables para el cultivo de MBM, dejando un espacio libre para la generación de gases | El tiempo de apisonamiento duro alrededor de 15 minutos. | anaerobiosis |  |

| OPERACIÓN O PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR ES BAJO CONTROL | EVIDENCIAS |
|--|---|---|--|--|---|
| Perforación y sellado hermético en la tapa del bidón | Se perforó la tapa del bidón de plástico con desarmador con un diámetro menor al de ½ pulgada para colocar una manguera de hule de ½ pulgada de 1 mt de largo, se fijó y se hermetizó la zona de unión con silicona caliente, para controlar la liberación de gases que se producen por la fermentación de los compuestos. | Controlar la liberación de gases que se producen por la fermentación de los compuestos. | El tiempo de realización fue de 10 minutos. | La hermetizacion del bidón |  |
| Sellado del bidón. | Se selló el barril con el sistema de hermetizacion del mismo bidón y se colocó la tapa con la manguera de ½ pulgada. | Circular el escape de gases que inicia con la fermentación o reproducción anaeróbica de los microorganismos. | El tiempo de realización fue de 10 minutos | La hermetizacion del bidón |  |
| Instalación de sistema anaeróbico | Se colocó junto al barril una botella de plástico reciclado con 2 litros de agua, para introducir el extremo libre de la manguera de ½" dentro del agua de la botella. | Permitir la liberación de gases provenientes del barril sin retorno de aire proveniente del ambiente exterior. | El tiempo de realización fue de 10 minutos | La salida de gases del bidón hacia el recipiente con agua. |  |
| Reposo del material para su debida reproducción | Una vez concluido el proceso, se dejó reposar la mezcla por un periodo de 30 días, Para la debida reproducción de los MEM a temperatura ambiente y bajo techo, para lograr condiciones térmicas homogéneas al sitio de extracción de la materia orgánica. | Reproducir los microorganismos. | Periodo de 30 días | Temperatura Ambiente. |  |

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS MEDIANTE CULTIVOS GENÉRICOS

| OPERACIÓN O PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR | EVIDENCIAS |
|---|---|--|--|---|---|
| Preparación de medios de cultivo | Se preparó los cinco medios de cultivos: | | | | |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Agar Sabouraud (Levadura) • Agar Nutritivo (Bacillus spp). • Agar Avena (Actinomicetos) • Agar Cetrimide (Pseudomonas spp) • Agar Rogosa (Lactobacillus spp.) | Permitir en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de los microorganismos, | El tiempo de preparación de los medios de cultivo fue durante 2 horas. | Temperatura Peso |  |
| Preparación de las diluciones | Procedimiento: | | | | |
| | <ol style="list-style-type: none"> 1. Se tomó a consideración solo una muestra porque únicamente se contó con un punto elegido. 2. Se preparó 6 tubos de ensayos los cuales contendrán 9 ml de agua esterilizada. 3. Se pesará 1 g de la muestra. 4. Se realizó diluciones seriadas de las muestras hasta llegar a una dilución de 10^{-6}, se debe tomar en cuenta que la primera dilución 10^{-1} contiene 1 g de la muestra original y 9 ml de agua estéril. 5. Se homogenizó la muestra por 60 segundos y posteriormente se realiza la misma técnica hasta llegar a una dilución 10^{-6}. | La preparación de disoluciones se hizo con el propósito de homogenizar la mezcla y por consiguiente la siembra de la misma en los medios de cultivos preparados. | El tiempo de duración de este procedimiento fue de 1 hora. | El indicador para este procedimiento fue la homogenización. |   |

| OPERACIÓN | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR | EVIDENCIAS |
|----------------------------------|---|---|---|-------------|--|
| Siembra de las diluciones | <p>De la dilución 10⁻⁶ se tomó 1 ml de la solución y se sembró en una caja Petri que contiene el medio de cultivo preparado anteriormente y se esparció suavemente en la superficie del medio. Se dejó debidamente rotulado para saber a qué muestra pertenece cada caja.</p> <p>En el caso de hongos y levaduras se incubará las cajas Petri a 27°C por un periodo de 72 horas para verificar el crecimiento.</p> | <p>Reducir de manera progresiva, paso a paso, la concentración de la sustancia para ser colocados en la caja Petri y por consiguiente aislar los microorganismos.</p> | <p>El tiempo que duro este procedimiento fue de 72 horas.</p> | T y [] |  |
| Cultivo para bacterias | <p>Para bacterias se lo colocaron en la estufa a 37°C por 24 horas.</p> <p>Transcurrido el periodo de incubación se realizó la coloración respectiva para el reporte final de resultados.</p> | <p>Llegar a la incubación de microorganismos.</p> | <p>El tiempo que duro este procedimiento fue de 24 horas</p> | Temperatura |  |

| PROCESO | DESCRIPCION | PROPOSITO | TIEMPO | INDICADOR | EVIDENCIAS |
|---|---|---|--|--------------------------------------|--|
| Verificación del resultado final de la incubación de los microorganismos | <p>Luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la verificación de los resultados de manera visual</p> | <p>Determinar la existencia de los microorganismos.</p> | <p>Tiempo de duración del proceso fue de 30 min.</p> | <p>Presencia de microorganismos.</p> |  |

CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Para la determinación de la morfología de los microorganismos incubados en los medios selectivos se utilizó la técnica de coloración o tinción Gram como se describe a continuación.

Extracción de muestra

Se tomó directamente de la caja Petri una muestra significativa con asa de glaski; se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y se extiende por la superficie.

El propósito de esta operación fue extraer la muestra significativa para poder colocar en el portaobjetos

El tiempo que duro esta operación fue de 30 minutos

Muestra



Secado de muestra

Flameamos la muestra con ayuda de un mechero para que se quede completamente seco.

El propósito fue dejar a la muestra completamente seca para su mejor operacionalidad al momento de observar en el microscopio.

Promedio de 10 minutos.

Secado de muestras



***Inserción
de
reactivos.***

Se colocó los reactivos de tinción primero el cristal violeta durante 1 minuto; inmediatamente se lava y se coloca Lugol durante 1 minuto y se lava nuevamente; seguido se expone a alcohol cetona durante 1 minuto y se vuelve a lavar; finalmente se colocó safranina y se lava.

El objetivo de este proceso es colorear la muestra para su posterior identificación en el microscopio.

El tiempo de realización de esta operación fue de 30 minutos aproximadamente

El indicador para este proceso fue la coloración de la muestra.



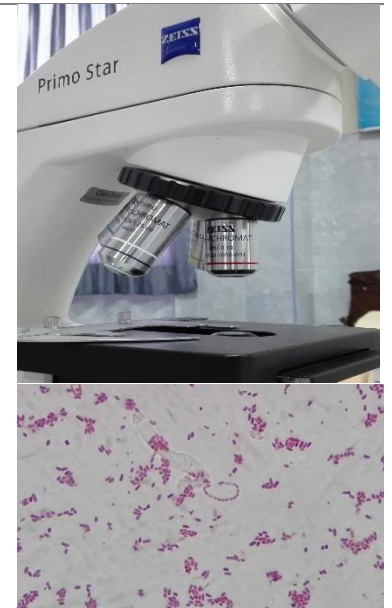
***Observación de los
microorganismos en el
microscopio***

Posteriormente se colocó una gota de aceite de inmersión en la placa y se observara en el microscopio con el objetivo (100x).

El propósito fue poder diferenciar las colonias Gram + de color azul y las colonias Gram – de color rojo. Esto se da gracias a que el Lugol lava el polisacárido de la pared de las bacterias Gram – y estas quedan incoloras, mientras que las bacterias Gram + conservan el tono azulado. Posteriormente la Safranina entra en contacto con las bacterias. Gram – y les da el tono rojizo.

El tiempo de realización de esta operación fue un periodo de 2 horas.

El indicador para esta operación fue la coloración de las bacterias.



4.1. CONTRASTE Y PRUEBA DE HIPOTESIS.

4.1.1. Contraste de la hipótesis general:

No cuenta con hipótesis,

El estudio descriptivo no cuenta con hipótesis, los estudios con hipótesis elaboran una conclusión; que se llega tras un estudio completo. En esta investigación solo se observó y se procedió a describir los pasos utilizados para el aislamiento de microorganismos eficientes de montaña. Lo que se pretendió es observar y luego hacer la descripción de lo que encontramos en un determinado momento dado.

CAPITULO V

DISCUSION DE RESULTADOS

La investigación que se realizó, describió los pasos para la obtención de microorganismos eficientes de montaña (MEM) y a la vez la caracterización in vitro de los microorganismos aislados, la mayor parte de la hojarasca recolectada fue de una especie de flora común de la zona; el (*Alnus glutinosa*), más conocido en nuestro medio como aliso; las discusiones y comparaciones del presente estudio son las siguientes:

Con respecto a Orbe.; en Honduras, 2017. Desarrollo una investigación cuyo objetivo fue evaluar la eficiencia de cuatro dosificaciones de biofertilizante Microorganismos de Montaña (MM) en rábano. Los resultados de la investigación fue que, el mayor crecimiento foliar, radicular y el peso de bulbo se obtuvo con la dosis T1 (27.20 ml) de biofertilizante. Los resultados son representativos para 1 m² , con ello se estimaron los costos de producción para 20 m² se evidenció que en rábano la dosis T1 (27.20 ml) de biofertilizante genera una producción económicamente viable. Algo muy diferente se realizó en mi investigación y es que partiendo de los objetivos en mi estudio aún no se llegó a corroborar la importancia económica que generan los microorganismos aislados, pero si la caracterización de cada uno de estos, uno de los objetivos del proceso de mi investigación fue la caracterización in vitro de los microorganismos aislados para ello se procedió a colorear las muestra para su posterior identificación al microscopio. Se diferenció las colonias Gram + de color azul y las colonias Gram – de color rojo. Esto se da gracias a que el Lugol lava el polisacárido de la pared

de las bacterias Gram – y estas quedan incoloras, mientras que las bacterias Gram + conservan el tono azulado. Posteriormente la Safranina entra en contacto con las bacterias. Gram – y les da el tono rojizo. Y a la vez producto de toda esta caracterización se llegó a identificar levaduras (azul de metileno, estructuras celulares ovoides); Bacilos (Gram + y Gram -); lactobacilos (Gram -); Actinomicetos (Gram + y Gram -) estructuras filamentosas; y Pseudomonas (Bacilos Gram -).

Del mismo modo Moreno y Velarde; en el Ecuador 2016 desarrollaron un trabajo de investigación cuyo objetivo fue aislar, caracterizar y proyectar los usos potenciales de microorganismos de tierra de montaña y subtrópico, en los cantones Cumandá y Guano de la provincia de Chimborazo. Se obtuvieron como resultados: Mediante la técnica de tinción de Gram se lograron identificar algunas bacterias por su forma y coloración que presentaron encontrándose en su mayoría bacilos Gram + y coco bacilos Gram + y Gram -, sometidos a diferentes temperaturas y ambientes aeróbicos y anaeróbicos. En mi investigación se preparó 6 tubos de ensayos los cuales contuvieron 9 ml de agua esterilizada, Se pesó 1 g de la muestra y se realizó diluciones seriadas de las muestras hasta llegar a una dilución de 10^{-6} , se tomó en cuenta que la primera dilución 10^{-1} contiene 1 g de la muestra original y 9 ml de agua estéril. Se homogenizo la muestra por 60 segundos y posteriormente se realiza la misma técnica hasta llegar a una dilución 10^{-6} . De esta última se tomó para la siembra en los respectivos agares de cultivo, una vez que los organismos crecieron se procedió

a la caracterización in vitro ya descrita en la anterior discusión y a la diferenciación de Gram + y Gram -.

Para Méndez; en Colombia, 2019 realizó una investigación, cuyo objetivo fue evaluar Microorganismos de Montaña (MM) aislados de suelo proveniente de la Finca El Exilio en el Municipio de Tenjo-Cundinamarca y establecer su potencialidad como aceleradores de compostaje y su posterior uso en cultivos aromáticos. El resultado la adición de MM en el proceso de compostaje disminuyó el tiempo de degradación de la materia orgánica, al aplicarlo en cultivos de Hierbabuena en proporción 70:30 presentó una diferencia significativa en los niveles de biomasa de la planta, mientras que para individuos de Toronjil se presentó una significancia tanto en biomasa como en la tasa de crecimiento al adicionarlo en proporción 1:100. La adición de MM es una alternativa agroecológica que sirve de insumo en el modelo de agricultura sostenible. En mi investigación no fue analizado la eficacia que tienen los MEM frente a la formación del Compost, tan solo se limita a explicar la metodología para formar el cultivo de hojarasca para la obtención de los MEM y su caracterización. Cabe resaltar que para Méndez, los microorganismos de montaña presentaron mayor efectividad para la elaboración del compost en cuanto al tiempo.

Para Recharte; Abancay - Perú el 2015 realizó una investigación cuyo objetivo fue evaluar la efectividad de aplicar microorganismos eficientes autóctonos en el rendimiento del cultivo de tomate. Para conducir el experimento se recurrió a un método por Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA), haciendo un total de 10 tratamientos, con 3 réplicas (incluido el testigo). Los factores evaluados fueron dosis de microorganismos eficientes con 3 niveles de

aplicación: 12.5 cc, 25 cc y 50 cc; y las frecuencias de aplicación con 3 niveles: cada 7 días, cada 14 días y cada 21 días. Los resultados obtenidos producto de las aplicaciones de los tratamientos sobre el cultivo de tomate, evidenciaron la existencia de respuestas distintas sobre la altura de la planta, número de tallos, número de flores, área foliar y el rendimiento.

Se concluye que la dosis 25 cc con intervalos de aplicación de 14 días, fue la que dio mejores resultados sobre los parámetros agronómicos de las plantas de tomate. Nuestra investigación en comparación con esta tiene 4 objetivos específicos que nos llevó a determinar la existencia de microorganismo eficientes de montaña, se seleccionó y recolecto la hojarasca, procedimiento cuya operación se describe en 3 momentos; luego de ello se elaboró la mezcla del cultivo de los microorganismos eficientes de montaña cuya operación se describe en 9 momentos según el centro nacional especializado en agricultura orgánica (CNEAO – INA); Luego de ello se inició con el aislamiento de los microorganismos cuya operación es descrita en 5 momentos; para finalmente caracterizar in vitro a los microorganismos aislados cuya operación se describe en 4 momentos en mi investigación.

Para Condezo en Tingo María - Huánuco, 2018 desarrollo el trabajo cuyo objetivo fue determinar la eficiencia del *Lactobacillus lactis* en el contenido de nutrientes y el menor tiempo en la producción de compost a partir de hojas de cacao (*Theobroma cacao* L.), se aplicó la metodología experimental y el diseño utilizado fue completamente aleatorizado, en la investigación se utilizó dos tratamientos, el tratamiento A con lactobacilos y el B sin este microorganismo eficiente; en mi presente investigación se llegó al identificar levaduras (azul de

metileno, estructuras celulares ovoides); Bacilos (Gram + y Gram -); lactobacilos (Gram -); Actinomicetos (Gram + y Gram -) estructuras filamentosas; y Pseudomonas (Bacilos Gram -). Cada una es sus respectivos medios de cultivo; Agar saburaud, nutritivo, rogosa avena y cetrimide. Visualizar anexo 5.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente estudio, permiten llegar a las siguientes determinaciones:

Con respecto al objetivo general:

Se logró determinar los microorganismos eficientes de montaña a partir de los desechos de hojarascas en la montaña de la margen derecha del río Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco, 2019 a la vez estos microorganismos fueron: levaduras (azul de metileno, estructuras celulares ovoides); *Bacilos* (Gram + y Gram -); *Lactobacilos* (Gram -); *Actinomicetos* (Gram + y Gram -) estructuras filamentosas; y *Pseudomonas* (Bacilos Gram -).

Con respecto al objetivo específico 1:

Se seleccionó y recolectó las hojarascas del bosque de la margen derecha del río Cozo, lugar Paccha, este proceso se realizó en 3 momentos, primero, se seleccionó el lugar denominado paccha como punto de recolección de los microorganismos de montaña ya que esta zona posee las condiciones naturales que dan origen a estos microorganismos presentes en tierra, hojas secas y troncos en descomposición a este momento se le denominó *acción del lugar para recolectar hojarascas* y tuvo una duración de 2 horas todo este proceso. Segundo se visitó el bosque con el fin de corroborar in situ la existencia de hojarasca en descomposición ello tuvo una duración de 20 minutos

Tercero se seleccionó y recolecto hojarasca que en su mayoría procedió del *Alnus glutinosa*.

Con respecto al objetivo específico 2:

Se elaboró la mezcla de cultivo para los microorganismos eficientes de montaña, este procedimiento tuvo 9 momentos que empezó: Primero con la extensión de plástico y selección de las hojas para beneficiar a la reproducción de organismos benéficos; segundo, se aplicó cascarilla de arroz para favorecer a la fermentación por parte de la mezcla. Tercero; se procedió a la disolución de melaza en agua para su aplicación este componente rico en potasio, calcio y magnesio favorecerá como nutriente a todo el preparado. Cuarto; se mezcló todos los ingredientes en un bidón. Quinto; compactación de la mezcla en un barril, esto para evitar la presencia de oxígeno y se malogre el cultivo. Sexto; perforación y sellado hermético en la tapa del bidón. Séptimo, se procedió al sellado del bidón. Octavo, instalación del sistema anaeróbico que permitirá la liberación de gases provenientes del barril sin retorno de aire proveniente del ambiente exterior y Noveno; reposo del material para su debida reproducción que tendrá una duración de 30 días.

Con respecto al objetivo específico 3:

Se aisló microorganismos eficientes de montaña para describir su potencial biotecnológico. El proceso consistió en 5 momentos. Primero la preparación de medios de cultivo que fueron Agar sabouraud, agar

nutritivo, agar avena, agar cetrimide, agar rogosa. Segundo, se preparó las diluciones. Tercero consistió en sembrar una muestra diluida en los tubos de ensayo 72 horas. Cuarto, cultivo de bacterias para ello el tiempo de duración fue de 24 horas. Y quinto que fue la verificación del crecimiento de los microorganismos que fueron según sus medios de cultivo: levaduras (azul de metileno, estructuras celulares ovoides) procedentes de agar saubourod; Bacilos (Gram + y Gram -) procedentes de agar nutritivo; lactobacilos (Gram -) procedentes de agar rogosa; Actinomicetos (Gram + y Gram -) estructuras filamentosas procedentes de agar avena; y Pseudomonas (Bacilos Gram -) procedentes de agar cetrimide. Cabe resaltar que todos estos microorganismos que crecieron tienen una importancia biotecnología para el medio ambiente.

Con respecto al objetivo específico 4:

Se caracterizó in vitro los microorganismos aislados tanto en forma de consorcios o cepas individuales. Diferenciando las colonias Gram + de color azul y las colonias Gram – de color rojo. Esto se da gracias a que el Lugol lava el polisacárido de la pared de las bacterias Gram – y estas quedan incoloras, mientras que las bacterias Gram + conservan el tono azulado. Posteriormente la Safranina entra en contacto con las bacterias. Gram – y les da el tono rojizo.

RECOMENDACIONES

A partir de las conclusiones arribadas del presente trabajo de investigación podemos dar las siguientes recomendaciones:

- Comprobar experimentalmente la eficacia de estos microorganismos eficientes de montaña en futuras investigaciones especialmente los beneficios que traería en el suelo como fertilizante y un precursor de crecimiento en plantas.
- Realizar un cultivo diferencial en próximos ensayos para visualizar e identificar más especies de microorganismos que crezcan en el cultivo de hojarasca.
- Elaborar con estos procedimientos ya descritos en mi investigación una guía, para que alumnos, futuros investigadores y población, pueda realizar el preparado de microorganismos eficientes tomando como base mi investigación.
- Difundir la presente investigación sobre todo en la escuela académica de ingeniería ambiental para demostrar la importancia microbiológica que tienen ciertos procedimientos en el aislamiento de microorganismos eficientes o benéficos para el medio ambiente.
- Realizar futuras investigaciones que pongan en comparación el preparado de hojarasca no solo con la especie de aliso, sino también con otras especies botánicas oriundas de la región de Huánuco, y con ello más adelante comparar diversos preparados y corroborar los más eficientes según el uso que se le pueda dar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez., caracterización de microorganismos benéficos provenientes de tres pisos altitudinales de Azuay - ecuador y su influencia en el cultivo de fresa. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2018.
- Cajahuanca, Optimización del manejo de residuos orgánicos por medio de la utilización de microorganismos eficientes (*saccharomyces cerevisiae*, *aspergillus* sp., *lactobacillus* sp.) en el proceso de compostaje en la central hidroeléctrica Chaglla. Universidad de Huánuco. 2016.
- Campos. Acosta, trabajaron en una investigación, este trabajo fue sobre la evaluación de microorganismos de montaña (mm) en la producción de acelga en la meseta de Popayán. Universidad del Cauca, facultad de ciencias agrarias, grupo de investigación en nutrición agropecuaria, Ingenieras Agropecuarias. Popayán, Colombia. 2013
- Condezo, Eficiencia de *lactobacillus lactis* en la producción de compost a partir de hojas de cacao (*theobroma cacao* l.) en la localidad de Puerto Nuevo, Distrito de Padre Felipe Luyando, provincia de Leoncio Prado, Departamento de Huánuco marzo - mayo de 2018. Universidad de Huánuco. 2018.
- Cruz Mora, Aprovechamiento y manejo de desechos orgánicos de cocina utilizando microorganismos eficientes de montaña (MEM) aislados de dos bosques secundarios de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica,

Escuela de Biología Laboratorio de Control Biológico del Centro Nacional
Especializado en Agricultura Orgánica. Costa Rica - 2010

Enriquez Brito, Jorge Luis & Viera Briones, Jorge Luis. Caracterización preliminar de aislamiento de Microorganismos, mediante la técnica de E.M., a nivel de comunidades vegetales en dos zonas de vida ecológicamente diferentes. [En línea](Tesis)Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la producción. (Guayaquil-Ecuador). 2010. pp. 2-11. [Consulta: 15 de Junio de 2019]. Disponible:<https://www.dspace.espol.edu.ec>

Hernández Fonseca, Hugo. "Biotecnología". *Rev. Cient. (Maracaibo)* [En línea], 2010, vol20. n.3, pp.225-226. [Consulta: 10 Junio 2019]. ISSN 0798-2259. Disponible:<http://www.scielo.org.ve/scielo>.

HIGA, Teruo. Una revolución para salvar la tierra. Tarragona- España: Enro Europe Branch, 2002, pp. 25-40.

Huamán, Efecto en la aplicación de microorganismos para la transformación de desechos orgánicos en compost en el distrito de Naranjillo-Mapresa. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 2015.

Monjarás C, José Antonio. *Microorganismos de Montaña* [En línea]. México. [Consulta: 25 de Junio de 2019]. Disponible: <http://viaorganica.org/microorganismos-de-montana>.

Moreno, Velarde, Aislamiento, caracterización de tierra de montaña y subtrópico durante el periodo 2016. Escuela Superior politécnica de Chimborazo. Ecuador - 2016.

Paniagua, Juan José. Preparación y usos de microorganismos de montaña, líquidos y sólidos [En línea]. Costa Rica, 2008. [Consulta: 24 de junio de 2019]. Disponible: <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=1778>.

Recharte, Evaluación de microorganismos eficientes autóctonos en el rendimiento del cultivo de tomate (*lycopersicum esculentum*, mill) en San Gabriel – Abancay. Universidad Tecnológica de los Andes. Abancay 2015.

Romero G. Propuesta para que la Neurocisticercosis sea declarada internacionalmente enfermedad de notificación Obligatoria. Scielo Public Health. 2000. Vol. 78

Valdez, Aplicación de microorganismos eficaces (EM) para el tratamiento de las aguas residuales domesticas en la localidad de Chucuito, Universidad Nacional del Altiplano. Puno. 2016

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

Título: “Determinación de microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña de la margen derecha del río Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco- 2019”.

| PROBLEMA GENERAL | OBJETIVO GENERAL | HIPÓTESIS GENERAL | VARIABLES | METODOLOGÍA | POBLACIÓN |
|---|---|---|---|---|--|
| ¿Cuál es la determinación de microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña de la margen derecha del río Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco, 2019? | Determinar microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña de la margen derecha del río Cozo, distrito de Quisqui, provincia y departamento de Huánuco, 2019. | Se realizara la determinación de los microorganismos eficientes a partir de los desechos de hojarascas en la montaña. | INDEPENDIENTE Desechos de Hojarascas | 1. tipo de investigación: enfoque cuantitativo y cualitativo 2. nivel de investigación: - Descriptivo. | 1. Población: En la presente investigación se considerará toda población de bacterias eficientes existentes en la zona de estudio presentes en las hojarascas. |
| PROBLEMAS ESPECIFICOS | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | | DEPENDIENTE | | |
| ¿Cuál es el proceso de selección y recolección de las hojarascas del bosque de la margen derecha del río Cozo, Lugar Paccha? | Seleccionar y recolectar las hojarascas del bosque de la margen derecha del río Cozo, Lugar Paccha. | | | 3. tipo de diseño: DCA | 2. Muestra: Conformado por los microorganismos presentes que se analizaron de solo una disolución de 10-6 ya que según mi criterio como investigador solo estamos analizando los MEM de un solo punto de evaluación, obtenidos dentro de la zona de bosques del lugar denominado Pachca. |
| ¿Cuál es el procedimiento para elaborar la mezcla de cultivo para los microorganismos eficientes de montaña?} | Elaborar la mezcla de cultivo para los microorganismos eficientes de montaña. | | Microorganismos Eficientes de Montaña | 4. tipo de muestreo: no probabilística | |
| ¿Cuál es el procedimiento para aislar microorganismos eficientes de montaña para evaluar su potencial biotecnológico? | Aislar microorganismos eficientes de montaña para evaluar su potencial biotecnológico. | | | | |
| ¿Cuál es la caracterizar in vitro los microorganismos aislados tanto en forma de consorcios o cepas individuales? | Caracterizar in vitro los microorganismos aislados tanto en forma de consorcios o cepas individuales. | | | | |

Tesista: VINCULA LORENZO, Juan Jaime

Anexo 2. Ficha de identificación de punto de muestreo

FICHA DE IDENTIFICACIÓN DE PUNTO DE MUESTREO



UDH
UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

FICHA DE IDENTIFICACIÓN DEL PUNTO DE MUESTREO - MONITOREO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: "DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS EFICIENTES A PARTIR DE LOS DESECHOS DE HOJARASCAS EN LA MONTAÑA DE LA MARGEN DERECHA DEL RIO COZO, DISTRITO DE QUISQUI, PROVINCIA Y DEPARTAMENTO DE HUÁNUCO - 2019".

NOMBRE DEL TESISISTA:

LOCALIDAD: MARGEN DERECHA DEL RIO COZO

NOMBRE DEL PUNTO DE MONITOREO: PACCHA

TIPO DE MUESTRA: HOJARASCAS.

UBICACIÓN: Coordenadas UTM: WGS 84

Norte: 8899757m

Este: 349061m

Altitud: 2200msnm.

LAS HOJARASCAS QUE SE TOMARON CONSTA DE 2 SACOS;
EL PUNTO DE MONITOREO CONSTA DE UN CLIMA TEMPLADO,
SEGÚN INFORMACIÓN TOMADA LA TEMPERATURA PROMEDIO
ES DE 20°C.

Anexo 3. Ficha de materiales utilizados para la reproducción de MEM

INSTRUMENTO

FICHA DE MATERIALES UTILIZADOS PARA LA REPRODUCCIÓN DE MEM

UNIVERSIDAD DE HUÁNUCO

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: "DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS
EFICIENTES A PARTIR DE LOS DESECHOS DE HOJARASCAS EN LA MONTAÑA DE
LA MARGEN DERECHA DEL RIO COZO, DISTRITO DE QUISQUI, PROVINCIA Y
DEPARTAMENTO DE HUÁNUCO - 2019".

ASUNTO : USO DE MATERIALES E INSUMOS.
FECHA DE REALIZACIÓN : 10 / 09 / 2019.
NOMBRE DEL TESISISTA : VINUCO LORENZO, JUAN JAIRO

MATERIALES UTILIZADOS PARA LA REPRODUCCION DE MEM

| CÓD. | PESO DE HOJARASCA | GAL. DE MELAZA | LITROS DE H2O | KG DE SEMOLINA |
|------|----------------------|----------------|------------------|-------------------|
| 01 | 02 sacos | 02 GALONES . | UN LITRO | 1500 (50 Kg) |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

Anexo 4. Resultados emitidos por el laboratorio Carlos Showin Ferrari



HOSPITAL MATERNO INFANTIL CARLOS SHOWIN FERRARI

SECCION LABORATORIO CLINICO

MUESTRA: COMPOST

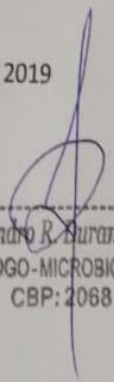
PROPIETARIO: JUAN VINCULA

FECHA 25 DE OCTUBRE

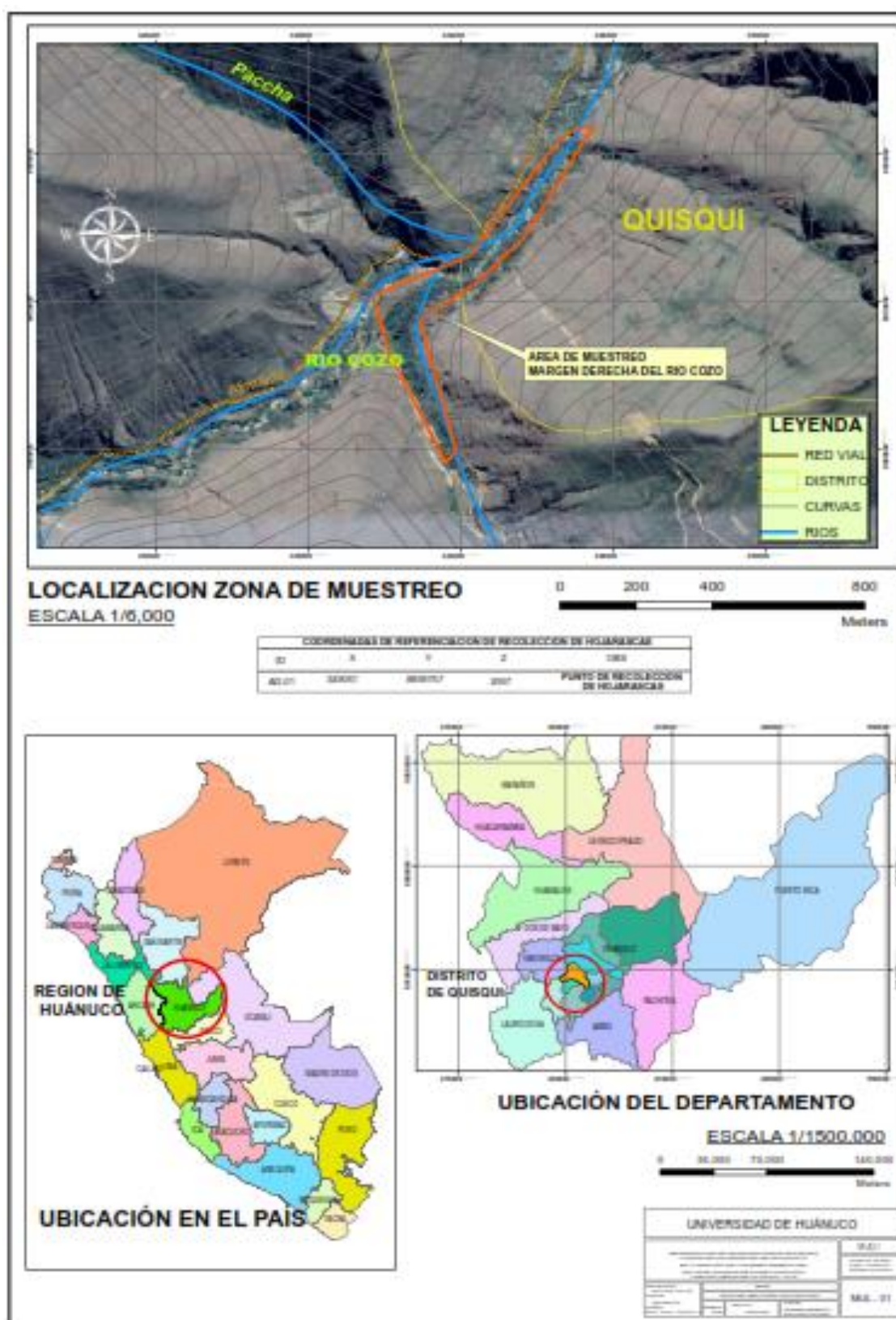
RESULTADOS:

| | MEDIOS DE CULTIVO | RESULTADOS | COLORACION |
|---|-------------------|---------------|--|
| 1 | AGAR SABORAUD | Levaduras | Azul de metileno Estructuras unicelulares ovoides |
| 2 | AGAR NUTRITIVO | Bacilos | Gram (cocos bacilos Bacteroides Gram positivos y negativos |
| 3 | AGAR ROGOSA | Lactobacilos | Gram (bacilos Gram negativos) |
| 4 | AGAR AVENA | Actinomicetos | Gram (estructuras filamentosas) Gram positivos y Gram negativos |
| 5 | AGAR CETRIMIDE | Pseudomonas | Gram (Bacilos Gram negativos) |

FECHA: 06 DE NOVIEMBRE DEL 2019


Alejandro R. Duran Nieva
BIÓLOGO-MICROBIOLOGO
CBP: 2068

Anexo 5. Mapa. Localización de zona de recolección de hojarasca



Anexo 6. Mapa. Área de influencia

